

Kontrolle des prä-mRNA Spleißens durch synthetische Riboswitche

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl.Biol. Florian Groher

aus Aschaffenburg

1. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß

2. Referent: Prof. Dr. H. Ulrich Göringer

Tag der Einreichung: 13.02.2015

Tag der mündlichen Prüfung: 13.04.2015

Darmstadt 2016

D 17

Anne und unserem kleinen Knirps

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Beatrix Süß** für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit in Ihrem Labor. Ich danke für die interessanten und interdisziplinären Projekte in den letzten Jahren und für das freie und unabhängige Arbeiten. Danke auch für die hervorragende Betreuung, die stetige Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit zur Teilnahme an Tagungen und Kongressen.

Herrn **Prof. Dr. H. Ulrich Göringer** danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Danken möchte ich auch **Prof. Dr. Alexander Heckel** und **Cem Özcoban** für die Synthesen biotinylierter Liganden und der Einführung in die Methodik chemischen Arbeitens.

Ich bedanke mich bei **Prof. Dr. Günter Mayer** für die Möglichkeit des Aufenthalts in seinem Labor und der Erlernung *bead*-basierter Selektionsstrategien.

Des Weiteren möchte ich mich bei **Dr. Manuel Grez** und **Dr. Stefan Stein** für die Durchführung der CD20-Experimente und die Einweisung in die Durchflusszytometrie bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt allen **aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Süßlabs** für die tolle Atmosphäre, die gemeinsamen Unternehmungen und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei **Karl, Alex, Markus, und Martin** für die gemeinsamen Mittags- und Kaffeepausen bedanken sowie die vielen Anekdoten und das Fachgesimpel. Mein weiterer Dank geht an **Katrin**, ohne die meine Westernblots wohl nicht halb so schön geworden wären, und an **Britta**, die mich tatkräftig bei dem ein oder anderen Experiment unterstützte ;)

Bei **Daniel** bedanke ich mich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt natürlich **meinen Eltern**, die mich immer unterstützen und für mich da sind.

Und natürlich **Anne**, die mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Groher, F. & Suess, B. Synthetic riboswitches - A tool comes of age. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 964–973 (2014).

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	2
2.1 RNA – vom Informationsträger zum Regulator	2
2.2 Synthetische Riboswitche	3
2.3 RNA-basierte Genregulation in Prokaryoten	3
2.4 RNA-basierte Genregulation in Eukaryoten	5
2.5 <i>In vitro</i> -selektierte Aptamere	8
2.6 Zielmoleküle der <i>in vitro</i> -Selektion	10
2.6.1 <i>Ciprofloxacin</i>	11
2.7 Das TetR-bindende Aptamer	11
2.7.1 <i>Eigenschaften des Tet-Repressors</i>	11
2.7.2 <i>Eigenschaften des TetR-bindenden Aptamers</i>	13
2.7.3 <i>Anwendungen des TetR-Aptamers</i>	17
2.8 Spleißen.....	18
2.9 Alternatives Spleißen	20
2.10 Zielsetzung dieser Studie	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Etablierung der <i>in vitro</i> -Selektion gegen Ciprofloxacin	25
3.1.1 <i>Toxizität von Ciprofloxacin</i>	25
3.1.2 <i>Zellgängigkeit von Ciprofloxacin</i>	27
3.1.3 <i>Immobilisierung von Ciprofloxacin</i>	28
3.1.4 <i>In vitro</i> -Selektion	30
3.1.5 <i>Überprüfung des Selektionsfortschritts</i>	33
3.1.6 <i>Charakterisierung der Einzelsequenzen</i>	33
3.1.7 <i>Bestimmung der Bindekonstanten</i>	36
3.2 Kontrolle der Intronretention durch das TetR-Aptamer	40
3.2.1 <i>Das Testsystem</i>	40
3.2.2 <i>Allgemeine Methodik</i>	42
3.2.3 <i>Optimierung des Liganden TetR</i>	43
3.2.4 <i>Äquivalenz von Zustand 1 und Zustand 3</i>	44
3.2.5 <i>Äquivalenz von Luziferase-Assay und (q)RT-PCR-Analysen</i>	45
3.2.6 <i>Testung verschiedener Aptamervarianten im chimären Intron</i>	48
3.2.7 <i>Variation der Intronposition</i>	49
3.2.8 <i>Variation der relativen Aptamerposition</i>	51
3.2.9 <i>Stammstabilität und –länge des TetR-Aptamers</i>	54
3.2.10 <i>Spezifität des Riboregulators</i>	59
3.2.11 <i>Relative Menge TetR- zu Reportergen-Plasmid</i>	60
3.2.12 <i>Induktion des Systems durch Doxycyclin</i>	60
3.2.13 <i>Regulation weiterer Introns</i>	62

3.2.14	Anwendungen	64
3.2.15	Platzierung des Riboregulators in CD20 und Tk39	66
3.2.16	CD20-Vorversuch: Westernblot.....	66
3.2.17	Induktion der Apoptose durch Rituximab.....	67
3.2.18	HSV-Tk39-Vorversuch: qRT-PCR	69
3.2.19	Induktion der Apoptose durch ACV und GCV	70
3.2.20	Verbesserte Apoptoseinduktion durch die destabilisierte Variante der TK39.....	72
3.2.21	Verwendung von rTetR	74
4	Diskussion.....	75
4.1	Selektion eines Ciprofloxacin-bindenden Aptamers	75
4.1.1	Ciprofloxacin als Zielmolekül der in vitro-Selektion.....	75
4.1.2	Auswahl des Selektionssystems.....	76
4.1.3	Interpretation der Sequenzierungsergebnisse.....	77
4.1.4	Diskrepanz in der Bestimmung der Bindekonstanten.....	78
4.1.5	Visualisierung des bioCFX-Streptavidin-Komplex	78
4.1.6	Ausblick	80
4.2	Konstruktion eines Riboregulators zur Kontrolle der Intronretention.....	81
4.2.1	Regeln zur Anwendung des Riboregulators.....	81
4.2.2	Begründung des experimentellen Aufbaus.....	81
4.2.3	Einfluss des Aptamers auf die basale Expression	82
4.2.4	Einfluss der Sequenzumgebung auf das Schaltverhalten	82
4.2.5	Einfluss der relativen Aptamerposition auf das Schaltverhalten.....	83
4.2.6	Stammstabilität und Zugänglichkeit der 5'SS.....	84
4.2.7	Einfluss der TetR-Menge und der Doxycyclin-Konzentration.....	86
4.2.8	Anwendung des Riboregulators in Apoptose induzierenden Genen.....	86
4.2.9	Anwendbarkeit des TetR-Aptamers in weiteren Introns	88
4.2.10	Die Verwendung von revTetR.....	89
4.2.11	Ausblick	89
5	Material und Methoden.....	90
5.1	Material.....	90
5.1.1	Übersicht über die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Basisvektoren.....	105
5.1.2	Klonierung der in dieser Studie konstruierten Plasmide.....	108
5.2	Methoden	117
5.2.1	Methoden mit E. coli	117
5.2.2	Methoden mit humanen Zellen	118
5.2.3	Methoden mit Nukleinsäuren.....	120
5.2.4	RNA-Extraktion aus humanen Zellen.....	123
5.2.5	cDNA-Synthese	124
5.2.6	Polymerasekettenreaktion	124
5.2.7	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	125

5.2.8	<i>In vitro</i> -Transkription.....	125
5.2.9	Proteinextraktion	125
5.2.10	Proteinbestimmung nach Bradford.....	126
5.2.11	Westernblot	126
5.2.12	Filterretention	126
6	Anhang	128
6.1	Abkürzungen	128
6.2	Einheiten	129
6.3	Dimensionen	129
6.4	Nucleobasen	129
6.5	Zusätzliche Abbildungen und Tabellen	130
6.6	Sequenzen der verwendeten Introns.....	139
6.6.1	<i>Chimäres Intron</i>	139
6.6.2	<i>β-Globin Intron 2</i>	139
6.6.3	<i>ATF4 Intron 1</i>	139
6.6.4	<i>EIF1 Intron 1</i>	139
6.6.5	<i>LBR Intron 9</i>	139
7	Literaturverzeichnis	140
8	Curriculum Vitae	149

1 Zusammenfassung

RNA-Aptamere sind Moleküle, die über *in vitro*-Selektion aus einer randomisierten RNA-Bibliothek gewonnen werden und ihre Zielmoleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden. In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, eine für Protein-Selektionen etablierte Methode auf niedermolekulare Substanzen zu übertragen. Zur Etablierung der Selektionsmethode, die auf Streptavidin-beschichteten, paramagnetischen *beads* beruhte, wurde das Fluorchinolon Ciprofloxacin als Zielmolekül verwendet. Das pharmakologisch gut untersuchte Ciprofloxacin wies eine niedrige Zytotoxizität und eine hohe Zellgängigkeit auf, was für die spätere *in vivo*-Applikation wichtige Eigenschaften darstellte. Die Selektion gegen Ciprofloxacin führte zu einer spezifischen Anreicherung von Aptameren. Der Großteil der angereicherten Sequenzen enthielt eine Stamm-Schleifenstruktur mit einem ausgebulgten Guanin benachbart zu einem G-U Wobble-Paar im Stamm und dem Sequenzmotiv GCAGGA in der terminalen Schleife. Die nähere Charakterisierung zeigte jedoch, dass die Aptamere nicht den freien Liganden alleine erkennen, sondern die Selektionsmatrix in die Bindung involviert ist. Eine Visualisierung des immobilisierten Ciprofloxacins an Streptavidin zeigte, dass sich der Ligand für eine erfolgreiche Selektion wahrscheinlich nicht genug von der Streptavidinmatrix abhebt und sich somit diese Selektionsmethode nicht für niedermolekulare Substanzen eignet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das TetR-bindende Aptamer verwendet, um Intronretention zu kontrollieren. Das TetR-Aptamer wurde in die Nähe der 5'-Spleißstelle eines chimären Introns platziert und durch Überexpression von TetR wurde die Zugänglichkeit des Spleißosoms zur Spleißstelle reduziert. Durch Zugabe von Doxycyclin konnte die TetR-TetR-Aptamer-Interaktion unterbrochen und so die 5'-Spleißstelle wieder zugänglich gemacht werden. Dies führte auf Reporterger-Ebene zu einem Regulationsfaktor von 12,6-fach. Durch die systematische Untersuchung von Intronposition, relative Aptamerposition sowie Stammlänge und -stabilität des Aptamers wurden Regeln für die Anwendbarkeit des Systems aufgestellt. Der Einfluss der Sequenzumgebung lies den Schluss zu, dass die 5'-Spleißstelle 2 bzw. 4 nt einzelsträngig vorliegen muss, damit es zur Konkurrenzsituation zwischen Spleißosom und TetR kommen kann. Die mittlere Stammstabilität wurde auf -15,0 kcal/mol berechnet und die relative Aptamerposition sollte bei 6 bzw. 7 nt nach der 5'-Spleißstelle liegen. Im Kontext des verwendeten chimären Introns konnte der durch Doxycyclin erhaltene Phänotyp (AN-Schalter) durch Variation des Abstands zur 5'-Spleißstelle umgekehrt werden (AUS-schalter). Darüber hinaus wurde in dieser Studie das TetR-Protein durch Anfügen einer N-terminalen Kernlokalisationssequenz für die Spleißregulation optimiert. Die Übertragbarkeit dieses synthetischen Riboregulators wurde durch Anwendung auf die Gene CD20 und HSV-TK gezeigt. Durch Kontrolle dieser Gene konnte die Induktion der Apoptose kontrolliert und die Zellviabilität von Hek-293-Zellen um den Faktor 3,5x beeinflusst werden.

Die hohe Modularität des Systems, die einfache Verwendung des Riboregulators in prinzipiell jedem Gen ohne weiteres Re-Design des Regulators selbst und die hohe Affinität und Reversibilität der Schaltung machen dieses System basierend auf der Kontrolle der Intronretention zum idealen Baustein, um synthetisch konstruierte Schaltkreise zu kontrollieren. Zudem kann dieses System genutzt werden, um die Grundlagen von Intronretention in Zukunft näher zu verstehen.

2 Einleitung

2.1 RNA – vom Informationsträger zum Regulator

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie sieht die DNA als Informationsspeicher für Proteine. Drei Arten von RNA-Molekülen übersetzen passiv die Informationen der DNA auf Polypeptide¹. Die *messenger*-RNA (mRNA) überträgt als Abschrift der DNA den genetischen Code zu den Ribosomen. Die Ribosomen, die ihrerseits auch hauptsächlich aus RNA bestehen (rRNA), übersetzen diesen Code in Proteine. Am Zusammenbau der Proteine am Ribosom sind zusätzlich die *transfer*-RNAs (tRNAs) beteiligt. Diese bringen die passenden Aminosäuren zum Ribosom, wo sie in die wachsende Polypeptidkette eingefügt werden.

Lange Zeit wurde die RNA nur als Bote und passives Biomolekül angesehen. Diese Wahrnehmung änderte sich jedoch in den letzten Jahrzehnte. Eine der wichtigsten Entdeckungen in diesem Zusammenhang war die Charakterisierung von regulatorischen RNA-Molekülen sowie katalytischer RNA-Spezies, die biochemische Reaktion umsetzen. Man bezeichnet diese RNAs als *noncoding*-RNAs (ncRNAs). ncRNAs spielen im Regulationsnetzwerk der Zelle eine wichtige Rolle und ihre Diversität hat letzten Endes zur Hypothese der „*RNA world*“ geführt².

ncRNAs wurden mittlerweile in allen Domänen des Lebens gefunden. In Eukaryoten sind die *small nuclear* RNAs (snRNAs), die *micro*RNAs (miRNAs), die *small interfering* RNAs (siRNAs) und die *small nucleolar* RNAs (snoRNAs) wichtige Vertreter der Klasse der ncRNA. Die snRNAs sind ein integraler Bestandteil des Spleißosoms und so am Spleißen der prä-mRNA beteiligt (siehe auch Kapitel 2.8)³. Die miRNAs, welche erstmals im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben wurden, führen zur Repression der Translation. Die Wirkung beruht auf der Ausbildung imperfekter Basenpaarung mit den untranslatierten Bereichen (UTRs) von mRNAs^{4,5}. siRNAs werden exogen in die Zelle eingebracht. Im Gegensatz zu den miRNAs führt hier eine perfekte Basenpaarung mit den UTRs von mRNAs zu deren Spaltung und letztlich zu deren Abbau⁶. Die sehr ähnlichen Wirkmechanismen von miRNAs und siRNAs werden als RNA-Interferenz (RNAi) bezeichnet. Die Klasse der snoRNAs ist an der Methylierung von rRNAs beteiligt⁷. In Prokaryoten sind kleine, regulatorisch aktive RNAs (*small regulatory* RNAs, sRNAs) an der Regulation der Stabilität von mRNAs, der Instandhaltung von extrachromosomalen Elementen und an der Antwort auf sich veränderten Umweltbedingungen beteiligt⁸.

Innerhalb der Klasse von regulatorischen RNAs nehmen auch Riboswitche einen zentralen Platz ein. Bei Riboswitchen handelt es sich um strukturierte ncRNA-Domänen, die selektiv niedermolekulare Metabolite binden und so die Genexpression der Zelle steuern können⁹. Der Großteil der beschriebenen Riboswitche sind in den nichtkodierenden Bereichen von mRNAs zu finden und kontrollieren die Transkription oder die Translation¹⁰. Es wurden jedoch auch Riboswitche beschrieben, die alternatives Spleißen in Eukaryoten steuern¹¹. Meist kontrollieren Riboswitche Gene, die mit dem Metabolismus des zugehörigen Liganden in Verbindung stehen. Die bekanntesten natürlichen Riboswitche binden die Liganden Thiaminpyrophosphat (TPP), Adenosylcobalamin (AdoCbl), S-Adenosylmethionin (SAM), Flavinmononucleotid (FMN), die Aminosäuren Lysin und Glycin sowie die Nukleobasen Adenin und Guanin¹².

Riboswitche bestehen aus Aptamerdomänen, welche innerhalb der Arten hochkonserviert sind und Expressionsplattformen, die nach Bindung des Liganden an die Aptamerdomäne die Expression modulieren. Diese Liganden werden meist in einer vorgeformten Bindetasche der Aptamerdomäne nach dem *induced fit*-Mechanismus gebunden¹³. Die Erkennung des Liganden kann über Wasserstoffbrücken-bindungen, elektrostatische und π - π -Wechselwirkungen erfolgen¹⁴. Die dreidimensionale Struktur von Riboswitchen kommt durch deren Nukleotidsequenz

und der Ausbildung von Basenpaarungen zu Stande. Hierbei ist es der RNA, im Gegensatz zur DNA, nicht nur möglich, kanonische Basenpaarungen auszubilden (G-C und A-U), sondern auch alle möglichen Arten nichtkanonischer Basenpaarungen sowie Wobble-Paarungen einzugehen. Auf Grund ihrer einzelsträngigen Natur, der 2'-OH-Gruppe und den verschiedenen Möglichkeiten der Basenpaarungen innerhalb der RNA, kann diese definierte Sekundärstrukturen wie Stammschleifen, symmetrische und asymmetrische Ausbuchtungen (*bulges*) sowie Pseudoknoten formen^{15,16}. Diese wiederum ermöglichen es der RNA über tertiäre Interaktionen hochkomplexe dreidimensionale Strukturen auszubilden^{17,18}. Dabei wird die strukturelle Stabilisierung des Ribose-Phosphatrückgrats und die Kompaktierung der RNA durch elektrostatische Wechselwirkungen mit mono- und bivalenten Kationen wie K^+ , Na^+ oder Mg^{2+} erreicht¹⁹.

2.2 Synthetische Riboswitche

Basierend auf den Prinzipien der Riboswitch-Regulation wurden unter Verwendung von RNA-basierten Sensor- und Regulatordomänen vielseitige synthetische Riboswitche konstruiert. Synthetisch hergestellte Riboswitche bestehen, wie auch ihre natürlichen Pendanten, aus einer Sensordomäne und einer Expressionsplattform. Die Sensordomänen stammen aus natürlichen Riboswitchen oder sind über *in vitro*-Selektion erzeugt worden. Die Expressionsplattformen wurden von natürlichen Systemen adaptiert und/oder über kombinatorische Ansätze optimiert. Teilweise konnten *in silico*-gestützte Berechnungen zur Verbesserung der synthetischen Riboswitche beitragen. Synthetische Riboswitche wurden sowohl für Prokaryoten, als auch für Eukaryoten entwickelt und auch die Domäne der Archaeen konnte erschlossen werden²⁰. Die Entwicklung von synthetischen Riboswitchen erweitert nicht nur die *toolbox* der synthetischen Biologen, sondern erlaubt auch ein tieferes Verständnis von RNA-RNA- und RNA-Ligand-Wechselwirkungen.

2.3 RNA-basierte Genregulation in Prokaryoten

Synthetische Riboswitche werden in Prokaryoten meist zur Regulation der Transkription oder der Translation genutzt. Hier werden die RNA-basierten Schalter sowohl in *cis*, als auch in *trans* eingesetzt. Die Transkription wird meist über die Ausbildung eines Transkriptionsterminators gesteuert, die Translation über eine Blockade der Ribosomenbindestelle (*ribosome binding site*, RBS).

Die Zugänglichkeit der kleinen ribosomalen Untereinheit zur RBS erfolgt über Sequestrierung bzw. Freisetzung der Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) (Abbildung 2.1 A). Durch Insertion des Theophyllin-Aptamers²¹ stromaufwärts der SD konnte die Zugänglichkeit der Ribosomen zur RBS reguliert werden²². Ferner wurde dieses Design genutzt, um die Chemotaxis von *E. coli* Theophyllin-abhängig zu steuern²³. Die Anpassung der RBS an andere Organismen demonstrierte die Übertragbarkeit dieses synthetischen Riboswitches. Die verwendeten Theophyllin-Schalter konnten somit nicht nur in *E. coli* angewandt werden, sondern auch in *Synechococcus elongatus*²⁴, *Bacillus subtilis*²⁵ und *Streptomyces coelicolor*²⁶ sowie in den pathogenen Organismen *Mycobacterium tuberculosis*²⁷ und *Francisella novicida*²⁸. Die dabei erzielten Veränderungen der Genexpressionen lagen im Mittel bei vier- bis achtfach. In *S. coelicolor* konnten sogar Werte von bis zu 200-fach gemessen werden, in Abhängigkeit des verwendeten Promotors.

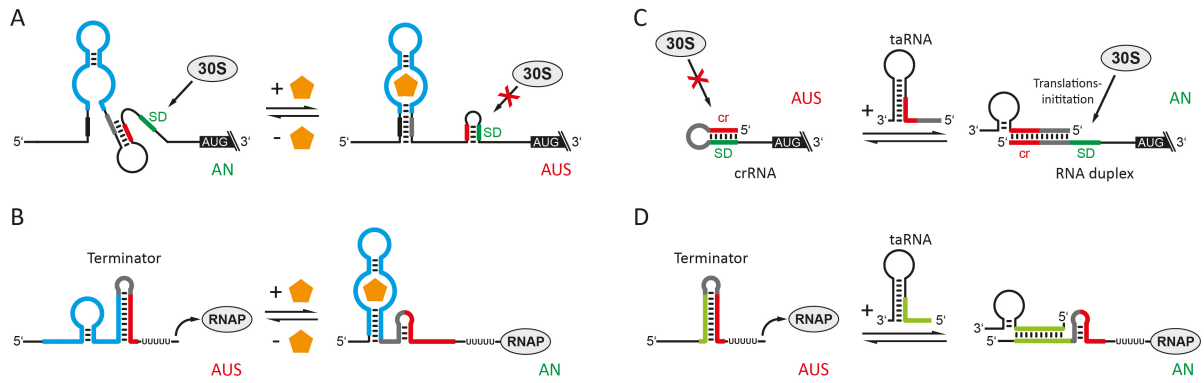


Abbildung 2.1 Regulationsmechanismen synthetischer Riboswitche in Bakterien.

A. Regulation der Translationsinitiation: In Abwesenheit des Liganden bildet sich eine Stammschleifenstruktur zwischen einem Teil des Stammes (hellgrau) des Aptamers (blau) und dem Sequenzelement, welches komplementär zur SD ist (rot), aus. Folgend liegt die SD (grün) frei und die Translation kann initiiert werden. In Anwesenheit des Liganden (orange) lagert sich die Aptamerdomäne um, die SD kann sich mit dem komplementären Sequenzelement paaren und die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit (30S) wird verhindert. **B.** Regulation der Transkriptionstermination: Das Aptamer ist über einen kurzen Linker (grau) an eine dem 3'-Ende des Aptamers komplementäre Sequenz (rot) fusioniert, gefolgt von einer Uridin-reichen Sequenz (Poly-U). In Abwesenheit des Liganden paart das 3' Ende des Aptamers mit der komplementären Sequenz und der Transkriptionsterminator (Haarnadelstruktur gefolgt von der Poly-U Region) bildet sich aus. Die Anwesenheit des Liganden und dessen Bindung an das Aptamer stabilisiert dessen Struktur, sodass sich der Terminator nicht ausbilden kann. Die Transkription kann fortgesetzt werden, was zu einer Expression des betreffenden Gens führt. **C.** Regulation der Translationsinitiation durch in *trans*-exprimierte RNAs: Eine kurze Sequenz (rot, „cis repressor“ crRNA), komplementär zur SD, ist stromaufwärts über einen kurzen Linker (grau) mit der SD verbunden. Nach Transkription bilden diese eine Stammschleife aus, was die Ribosomenbindung verhindert. In Anwesenheit einer überexprimierten *trans*-aktivierenden RNA (taRNA), welche komplementär zur crRNA und Teilen der Linker-Region ist, wird die SD freigesetzt und die Translation kann initiiert werden. **D.** Ähnlich zu dem in B. und C. präsentierten Mechanismus wird eine taRNA genutzt, um einen Transkriptionsterminator aufzulösen.

Das Theophyllin-Aptamer wurde auch verwendet, um die Antitermination in Bakterien zu kontrollieren (Abbildung 2.1 B). Hierfür wurde das Aptamer über einen Linker an eine dem 3'-Ende des Aptamers komplementäre Sequenz fusioniert. Dieser folgt eine Uridin-reiche Sequenz, die neben der Ausbildung einer Stammschleifenstruktur (= Terminator) für die Transkriptionstermination benötigt wird. Der Linker sowie die komplementäre Sequenz (= Expressionsplattform) wurden in diesem Ansatz *in silico* generiert, optimiert und im Anschluss *in vivo* auf Funktionalität geprüft. Während sich in Abwesenheit des Liganden der Terminator ausbildet und die Transkription stoppt, bildet sich in Anwesenheit des Liganden der Terminator nicht aus, da hier die Faltung des Aptamers begünstigt ist. Durch die Verwendung des Theophyllin-Aptamers und eines Transkriptionsterminators war es möglich, das nachgeschaltete Reportergen um den Faktor 6,5-fach zu regulieren²⁹.

Eine weitere Art der Kontrolle der Genexpression (in bakteriellen Systemen) ist die Expression von RNA-Molekülen in *trans*. Eines der ersten Beispiele für ein derartiges System bestand in der Interaktion einer „cis-reprimierenden“ mit einer „trans-aktivierenden“ RNA (crRNA bzw. taRNA) über kanonische Basenpaarungen³⁰. Die crRNA befindet sich stromaufwärts über einen Linker an die SD gekoppelt und bildet mit dieser Watson-Crick Basenpaarungen aus, wodurch die Translationsinitiation verhindert wird. Die ausgebildete Stammschleifenstruktur wird durch die *trans*-exprimierte taRNA aufgelöst und setzt so die SD frei, was zur Translationsinitiation führt (Abbildung 2.1 C). Dieses System konnte verwendet werden, um einen genetisch-kodierten Zähler in *E. coli*³¹ sowie einen bakteriellen Notausschalter (*kill switch*) zu konstruieren³². Ein ähnlich aufgebautes System wurde verwendet, um mit einer taRNA einen Terminator aufzulösen

(Abbildung 2.1 D) ^{33,34}. Im Weiteren wurde die taRNA mit dem Theophyllin-Aptamer in einer Pseudoknoten-ähnlichen Art und Weise miteinander fusioniert, um über die genannte Strategie die Genexpression Theophyllin-abhängig herunterzuregulieren ³⁵.

2.4 RNA-basierte Genregulation in Eukaryoten

In Eukaryoten konnten synthetische Riboswitche dazu eingesetzt werden, die Zugänglichkeit der kleinen ribosomalen Untereinheit zum 5'-cap der mRNA sowie das *scanning* dieser zu steuern. Auch wurde über Aptamere die katalytische Selbstspaltung von Ribozymen und somit die Halbwertszeit von mRNAs manipuliert. Die Regulation des Spleißens von prä-mRNAs wurde über die Zugänglichkeit spleißosomaler Faktoren zu bestimmten Elementen innerhalb von Introns moduliert.

Bereits 1998 konnten Werstuck und Green über ein Aptamer, das spezifisch den Hoechst-Farbstoff H33258 bindet, die Reporter-gen-Aktivität in eukaryotischen Zellen um den Faktor 10 regulieren ³⁶. Hierfür wurde das Aptamer in den 5'UTR einer Luziferase integriert und durch Zugabe des Liganden die Genexpression reprimiert (Abbildung 2.2 A). Ähnliche Beobachtungen konnten auch in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* gemacht werden. In diesen Experimenten wurde durch Verwendung des Malachitgrün-Aptamers und des Malachitgrün-Derivats Tetramehtylrosamin als Ligand ein Cyclin-Gen gesteuert ³⁷. Das Aptamer wurde auch hier in den 5'UTR des betreffenden Gens platziert. Als Resultat der 10-fachen Herabregulation der Cyclin-Genexpression konnte der Zellzyklus verlangsamt und die Zell-Morphologie beeinflusst werden. Das Tetracyclin-Aptamer (Tc-Aptamer) ³⁸ konnte, um die Genexpression zu steuern, in ähnlicher Art und Weise eingesetzt werden ³⁹. Insetiert in verschiedene Reportergene, wurde deren Expression reversible und dosisabhängig reprimiert ⁴⁰. Die Insertion nahe des 5'-cap verhinderte die Anlagerung der kleinen ribosomalen Untereinheit, wenn der Tc-Aptamer-Komplex sich ausbildete (Abbildung 2.2 A). *In vitro*-Translationsexperimente konnten zeigen, dass bei Insertion des Aptamers nahe des Startcodons die ligandengebundene Form mit der Formation der 80S Ribosomen interferiert. Wahrscheinlich als Resultat der Blockade des *scanning*-Prozesses (Abbildung 2.2 B). Die Effizienz der Regulation war abhängig von der Position und der Anzahl der inserierten Tc-Aptamere ⁴¹. Eine weitere Verbesserung des Systems konnte durch Verwendung des Neomycin-Aptamers erzielt werden ⁴². Durch *in vitro*-Studien mit Weizenkeimextrakt und *in vivo*-Studien mit *Xenopus* Oocyten konnte in einem ähnlichen Ansatz die Genexpression durch das Biotin-⁴³, als auch durch das Theophyllin-Aptamer gesteuert werden ⁴⁴. Im Vergleich zu *S. cerevisiae* waren die Konstrukte, welche das Aptamer am 5'-cap der mRNA trugen, besser zu regulieren ⁴⁰. Dies Ergebnis stand im Einklang mit anderen Untersuchungen, bei denen Stammschleifen nahe des 5'-cap eingefügt wurden, um so die Translation zu inhibieren. Stammschleifen wirken in höheren Eukaryoten stärker inhibierend, wenn sie *cap*-proximal eingebracht werden ⁴⁵. In Hefe bestehen dagegen nur kleinere Unterschiede zwischen *cap*-proximaler und -distaler Insertion ^{46,47}, was einen unterschiedlichen Mechanismus zwischen Hefe und höheren Eukaryoten vermuten ließ.

Die Kontrolle der Genexpression über allosterisch regulierte, selbstspaltende Ribozyme (oft auch Aptazyme genannt) geschah erstmals unter Verwendung des ATP-Aptamers ^{48,49}. Das Aptamer wurde durch rationales Design an ein Minimalkonstrukt des *Schistosoma mansoni* Hammerhead-Ribozyms fusioniert. Abhängig von der Linker-Region, dem sogenannten Kommunikationsmodul, konnte die Selbstspaltung durch ATP gesteuert werden (Abbildung 2.2 C). Durch Verwendung unterschiedlicher Kommunikationsmodule konnte die ATP-abhängige Selbstspaltung sowohl gefördert als auch inhibiert werden ⁵⁰. Für weitere Arbeiten war das Minimalkonstrukt aber aufgrund der fehlenden Schleifen-

Schleifen-Interaktion (*loop-loop interaction*), die für die Faltung bei physiologischen Magnesiumkonzentrationen notwendig sind, unzureichend^{51,52}. Mit dem Volllängenkonstrukt des Hammerhead-Ribozyms konnten Spaltungen bei physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen *in vivo* beobachtet werden⁵³. Das Hammerhead-Ribozym wurde mit dem Theophyllin-Aptamer bzw. der Aptamer-Domäne des Thiaminpyrophosphat-Riboswitches fusioniert, um im bakteriellen System die sequestrierte SD freizusetzen⁵⁴. Darüber hinaus konnte durch die Verwendung eines *in vitro*-selektierten Aptamers sowie einer natürlichen Aptamerdomäne die Modularität dieses Ansatzes gezeigt werden. Während Theophyllin- und Tc-abhängige Ribozyme außergewöhnlich schnelle Spaltungen *in vitro* unter physiologischen Magnesiumkonzentrationen zeigten⁵⁵, konnten in *S. cerevisiae* nur moderate Spaltgeschwindigkeiten festgestellt werden⁵⁶. Durch rationales Design konnten die Schalter aus der Bäckerhefe nicht nur hinsichtlich der Spaltkinetik verbessert werden, sondern auch in höheren Eukaryoten Anwendung finden⁵⁷. Über die Kontrolle der mRNA-Stabilität hinaus konnten auch die Prozessierung von tRNAs⁵⁸, die rRNA-Prozessierung⁵⁹ und RNAi^{60,61} reguliert werden.

Die Kontrolle von konstitutivem und alternativem Spleißen wurde durch die Insertion von Aptameren in der Nähe von fürs Spleißen notwendiger Sequenzen sowie der Blockade der Zugänglichkeit dieser erreicht. Die wichtigen Elemente für die Spleißreaktion sind die 5'-Spleißstelle (5'SS), die 3'-Spleißstelle (3'SS) und der Verzweigungspunkt. Durch Einsatz des Theophyllin-Aptamers konnte in *in vitro*-Studien gezeigt werden, dass durch die Inserierung innerhalb der 3'SS die Menge an gespleißter prä-mRNA durch Theophyllin-Applikation reduziert werden konnte⁶². Die Daten dieser Studie demonstrieren, wie eine Blockierung der Zugänglichkeit das Spleißmuster beeinflussen kann. Das gleiche System wurde auch verwendet, um den Verzweigungspunkt zu maskieren und das Spleißen in HeLa-Zellen zu beeinflussen⁶³. In Gegenwart von Theophyllin wurde hier das stromabwärts liegende Exon doppelt so häufig ausgelassen wie ohne Theophyllin. Ähnliche Ergebnisse konnten unter Verwendung des Tc-Aptamers erreicht werden (Abbildung 2.2 D), wobei dieses entweder in die Nähe der 5'SS bzw. in die Nähe des Verzweigungspunktes platziert wurde⁶⁴. Eine maximale Regulation konnte beobachtet werden, wenn das Aptamer in die Nähe der 5'SS gesetzt wurde. Intramolekulare Basenpaarungen zwischen dem Stamm des Aptamers und der 5'SS führten zur Maskierung der Spleißstelle und wahrscheinlich zur verminderten Zugänglichkeit des U1-snRNP. Die Regulationsfaktoren konnten unter Verwendung der Minimalversion des Tc-Aptamers⁶⁵ auf das 16-fache gesteigert werden. Die Verwendung von einem zweiten Aptamer-enthaltenden Intron steigerte den Regulationsfaktor auf das 32-fache. Hierbei wäre anzumerken, dass die Insertion des Aptamers am Verzweigungspunkt keine regulatorischen Eigenschaften zeigte, was im Kontrast zu den Daten aus HeLa-Zellen steht.

Unter Ausnutzung der Interaktion des Hüllproteins des Bakteriophagen MS2 mit der Stammschleifenstruktur, die im Phagengenom dieses einzelsträngigen RNA-Virusse zu finden ist, konnte alternatives Spleißen ebenso gesteuert werden. Die proteinbindende RNA-Sequenz wurde an verschiedenen Stellen innerhalb zweier Introns, die ein alternativ gespleißtes Exon flankieren, positioniert. Dieses sogenannte Kassetten-Exon beinhaltet ein Stoppcodon, das zur reduzierten Genexpression führt, wenn das Exon in die fertig mRNA inkludiert wird⁶⁶. Die durch Proteinbindung induzierte sterische Hinderung führte hier wahrscheinlich zum veränderten Spleißmuster. Durch Inserierung mehrerer Aptamere innerhalb verschiedener intronischer Sequenzen konnten die Autoren die Verrechnung verschiedener Eingangsinformationen (Vorhandensein von verschiedenen Proteinen) zu einem definierten Ausgangssignal zeigen.

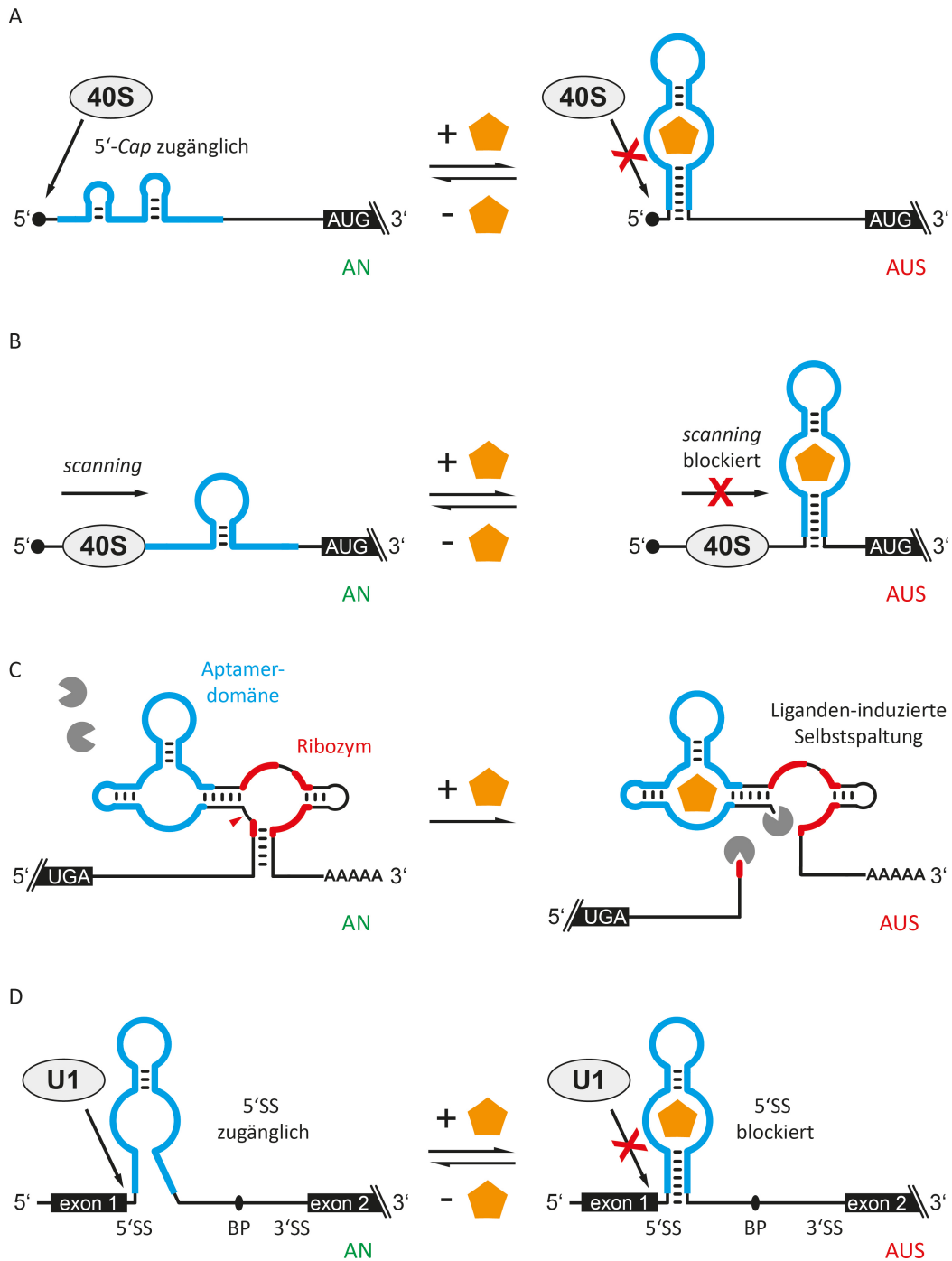


Abbildung 2.2 Regulationsmechanismen synthetischer Riboswitche in Eukaryoten.

A. Regulation über die Bindung der kleinen ribosomalen Untereinheit: In Abwesenheit des Liganden (orange) ist die Tertiärstruktur des Aptamers (blau), welche in den 5'UTR inseriert wurde, ungefaltet und die kleine ribosomale Untereinheit (40S) kann die mRNA binden. In Anwesenheit des Liganden faltet sich das Aptamer in seine Tertiärstruktur und verhindert die Anlagerung. **B.** Regulation des ribosomalen *scannings*: Die Insertion der Aptamerdomäne in eine Position nahe des Startcodons (AUG) verhindert, im ligandengebundenen Zustand, das *scanning* der kleinen ribosomalen Untereinheit und im Folgenden die Translationsinitiation. **C.** Kontrolle der Genexpression über katalytisch aktive Riboswitche: Das in untranslatierte Bereiche eingeführte Aptazym spaltet ligandenabhängig sich selbst und reguliert dadurch die Halbwertszeit der mRNA. Nach Spaltung der mRNA wird diese über Exoribonukleasen (grau) degradiert (in Bakterien kann dieser Mechanismus auch genutzt werden, um eine sequestrierte SD wieder freizusetzen und so die Translation zu starten). **D.** Regulation des Spleißens der prä-mRNA: Das Aptamer wird hier innerhalb eines Introns einer eukaryotischen mRNA integriert um die Zugänglichkeit wichtiger Elemente, wie die 5' Spleißstelle (5'SS), den Verzweigungspunkt (*branch point*, BP) oder die 3' Spleißstelle (3'SS), zu kontrollieren. Ligandenbindung inhibiert den Spleißprozess oder verstärkt *exon skipping*.

2.5 *In vitro*-selektierte Aptamere

Wie bereits zuvor dargelegt, nutzen synthetische Riboswitche meist RNA-Aptamere als Binde- bzw. Sensordomänen. Aptamere sind kleine Ribonukleinsäure-Moleküle, die im Prinzip in der Lage sind jeden Liganden von Interesse mit hoher Affinität und Spezifität zu binden. Generiert werden Aptamere durch *in vitro*-Selektion, auch SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*) genannt. Die *in vitro*-Selektion wurde vor über zwei Dekaden entwickelt, noch bevor die ersten natürlichen Riboswitche gefunden wurden^{67,68}. Die *in vitro*-Selektion ist ein iterativer Prozess, bei dem ein randomisierter RNA-Pool, bestehend aus $10^{14} - 10^{15}$ Molekülen, mit dem immobilisierten Zielmolekül zusammengebracht und nach Partitionierung die bindenden Spezies spezifisch eluiert und amplifiziert werden (Abbildung 2.3). Nichtbindende RNA-Moleküle werden durch Waschschriffe entfernt. Während des Verlaufs der *in vitro*-Selektion wird die Stringenz der Waschschriffe, aber auch die der Elutionsschriffe graduell erhöht, was zu Aptameren mit Affinitäten im picomolaren Bereich führen kann³⁸. Darüber hinaus sind Aptamere durch die Wahl geeigneter Selektionsbedingungen auch in der Lage, chemisch nah verwandte Moleküle zu unterscheiden²¹. Über die Jahre hinweg wurde eine Vielzahl an Abwandlungen dieses Prozesses für verschiedene Anwendungen entwickelt, meist um den Ablauf im Allgemeinen zu beschleunigen oder diesen automatisierbar zu machen⁶⁹. Weitere Modifikationen des Selektionsprozesses zielten darauf ab, bei den erzeugten Aptameren eine Resistenz gegenüber Nukleasen zu schaffen (Spiegelmer-Technologie)⁷⁰ oder aber Aptamer zu erzeugen, die zwei Zielmoleküle hochaffin binden können (*Toggle-SELEX*)⁷¹.

Die Bindeaffinitäten von *in vitro*-selektierten Aptameren kann durch verschiedenste Methoden bestimmt werden. Neben spektroskopisch basierten Methoden (Fluoreszenz-Intensität/-polarisation, UV-vis-Absorption, circularer Dichroismus, NMR) finden auch solche Anwendung, die auf Separation beruhen, wie zum Beispiel die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie sowie Äquilibriumdialyse, Affinitätschromatographie und Affinitätsselektrophorese (EMSA, *electrophoretic mobility shift assay*). Weitere Verfahren sind die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC), Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR), *in-line probing* und *footprinting assays*. Die genannten Methoden besitzen ihre eigenen, spezifischen Vor- und Nachteile, sie können aber prinzipiell in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Der Unterschied der beiden Gruppen liegt in der Notwendigkeit der Modifikation einer oder beider der zu untersuchenden Biomoleküle. Methoden, die weder eine Markierung, noch eine Immobilisierung der Moleküle voraussetzt, sind deshalb zu bevorzugen, weil oftmals die Bindung der RNA nicht nur den Ligand, sondern auch die Matrix einschließt. Dies kann zu falsch-positiven Ergebnissen während der Bestimmung der Bindekonstanten führen. Intrinsische Eigenschaften der Moleküle selbst, wie zum Beispiel fluoreszente Eigenschaften, sollten während dem Nachweis der Bindung genutzt werden.

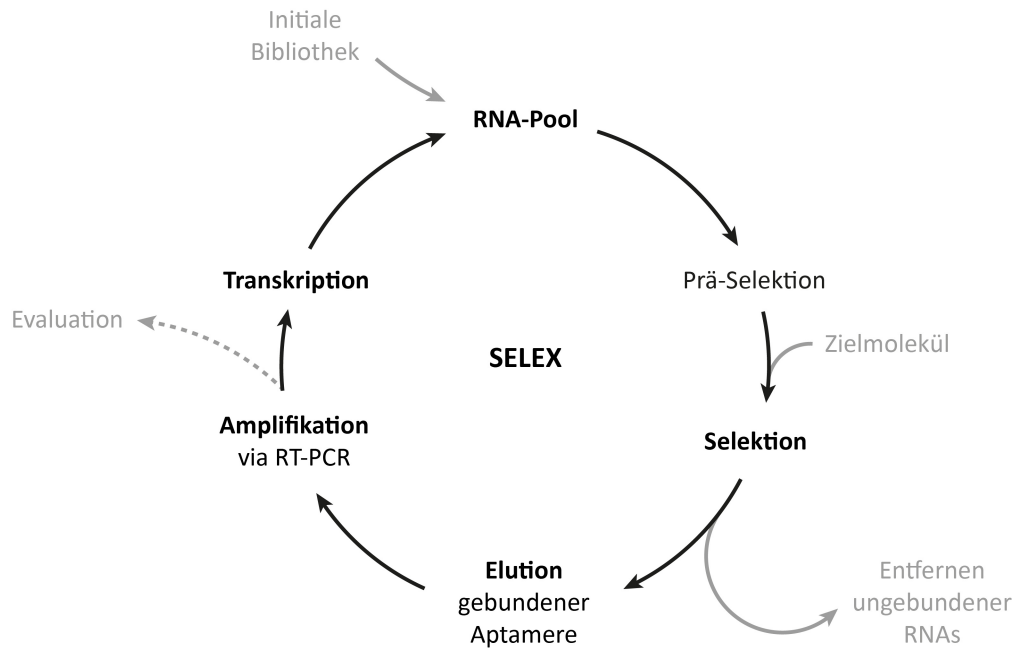


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der *in vitro*-Selektion.

Eine DNA-Bibliothek wird in RNA transkribiert und stellt den initialen, randomisierten RNA-Pool dar. Dieser Pool wird zunächst in der Prä-Selektion mit der für die Immobilisierung notwendigen Matrix inkubiert. Die nichtbindenden RNA-Moleküle werden dann mit dem immobilisierten Zielmolekül zusammengebracht (Selektion). Nach Bindung der Aptamere werden ungebundene RNAs entfernt und die Binder werden (spezifisch) eluiert. Diese RNAs werden über reverse Transkription und PCR (RT-PCR) amplifiziert. Die Transkription der Amplifikate in RNA stellt wieder einen (angereicherten) RNA-Pool her, sodass der SELEX-Zyklus erneut beginnen kann. Von Runde zu Runde wird die Stringenz erhöht und erreicht ab einem gewissen Punkt ein solches Maß an Anreicherung, dass die PCR-Amplifikate evaluiert werden können.

Bis dato wurden über *in vitro*-Selektionen eine Vielzahl an Aptameren, die niedermolekulare Substanzen binden, selektiert⁶⁹. Jedoch finden nur die wenigsten Anwendung in der Zelle und noch weniger im Design von Riboswitchen. Die am häufigsten verwendenden Aptamere in synthetischen Riboswitchen binden Tc, Theophyllin und Neomycin bzw. Tetramethylrosamin (Abbildung 2.4)⁷². Im weiteren Verlauf soll neben TetR und dem TetR-bindenden Aptamer auch dargestellt werden, welche Kennzeichen Zielmoleküle bereits erfolgreich selektierter Aptamere besitzen und welche dieser Eigenschaften für eine Anwendung im biologischen System von Vorteil sind.

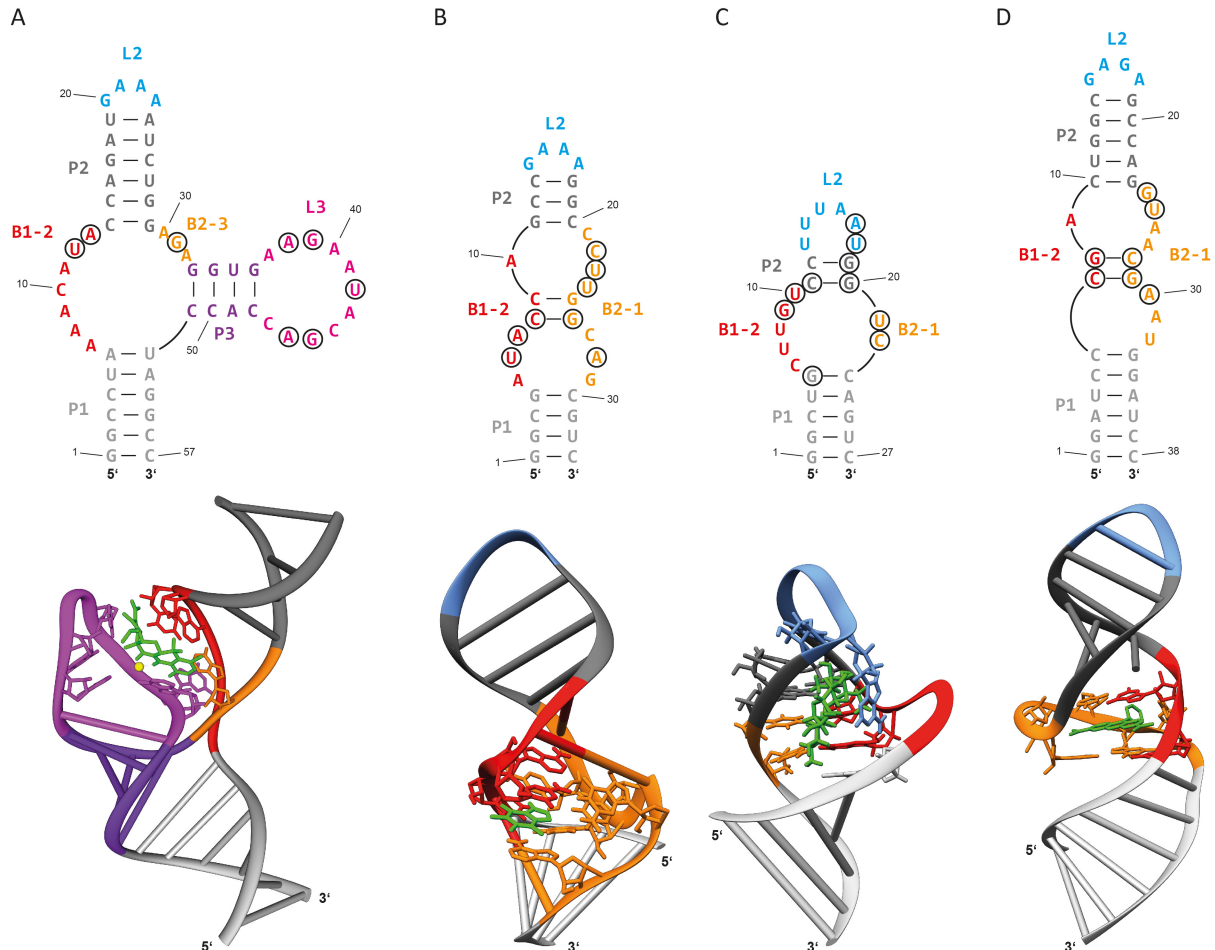


Abbildung 2.4 In biologischen Systemen häufig genutzte Aptamere.

Gezeigt sind die 2D- und 3D-Strukturen des Tetracyclin- (A), des Theophyllin- (B), des Neomycin- (C) und des Malachitgrün-Aptamer (D). Stämme, Ausbuchtungen (*bulges*) und Schleifen (*loops*) sind mit P, B und L gekennzeichnet und in jeder Abbildung mit dem gleichen Farbcode versehen. Nukleotide, die in die Bindung involviert sind, sind in der 2D-Struktur umrandet und in der 3D-Struktur hervorgehoben. Magnesiumionen sind als gelber Ball dargestellt, Liganden sind grün koloriert. Die 3D-Strukturen wurden mit UCSF Chimera unter Verwendung der PDB-Einträge 3EGZ, 1EHT, 2KXM und 1F1T erstellt. Die Details zu den einzelnen Aptameren können in folgenden Publikationen nachgeschlagen werden ⁷³⁻⁷⁶.

2.6 Zielmoleküle der *in vitro*-Selektion

Die Zielmoleküle, die bereits in *in vitro*-Selektionen gegen niedermolekulare Substanzen eingesetzt wurden, decken ein breites Spektrum an Substanzklassen ab. Aptamere wurden gegen organische Farbstoffe, Aminosäuren, Vitamine, Coenzyme, Antibiotika, Peptide, Proteine und ganze Zellen entwickelt⁶⁹. Aus der großen Auswahl an *in vitro*-selektierten Aptameren gegen niedermolekulare Substanzen (ca. 70) befinden sich momentan nur wenige in biologischen Systemen in Benutzung⁷². Dieser Unterschied legt nahe, dass die Eigenschaften niedermolekularer Substanzen für die Applikation entscheidend sind. Deshalb sollten bei der Auswahl von Zielmolekülen für eine *in vitro*-Selektion mehrere Parameter bedacht werden. Die potenziellen Liganden können nicht nur in ihrer Größe variieren, sondern auch in der Anzahl funktioneller Gruppen, die mit der RNA in Wechselwirkung treten können. Zwar ist eine größere Anzahl an funktionelle Gruppen förderlich für eine Selektion, aber nicht zwingend notwendig (vgl. Aminoglykosid-Aptamere und

Aptamerdomäne im Fluorid-Riboswitch)⁷⁷. Ein weiterer, wichtiger Parameter für die Anwendung in biologischen Systemen ist die Frage nach der Zellgängigkeit und der Zytotoxizität. Nicht-toxische Substanzen eignen sich besonders für die Anwendungen in Riboswitchen und sind unter zugelassenen Antibiotika zu finden. Die Klasse der zugelassenen Antibiotika garantiert nicht nur eine geringe Toxizität, da diese meist an bakteriellen Proteinen ihre Wirkung entfalten, sondern auch eine guten freie Diffusionsrate über Lipiddoppelschichten. Die Bindekonstanten bisheriger Aptamere mit Zielmolekülen aus dieser Klasse reichen von mittleren micromolaren Konzentrationen bis in den picomolaren Bereich hinein. Einige dieser RNA-Aptamere haben auch eine Anwendung als Riboswitch gefunden⁷².

2.6.1 Ciprofloxacin

Die niedermolekulare Substanz Ciprofloxacin (CFX) ist ein synthetisches Antibiotikum und gehört in die Gruppe der Fluorchinolone-Antibiotika (Abbildung 2.5). Die bakterizide Wirkung entfaltet CFX über die Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II⁷⁸. CFX besitzt mit seinem Chinolincarbonsäure-Gerüst eine flache und starre Struktur, welche auch beispielsweise bei Tc, Neomycin und Biotin zu finden ist. Neben der niedrigen Plasmaproteinbindung besitzt CFX eine hohe Bioverfügbarkeit und eine sehr hohe mittlere letale Dosis (LD₅₀) von >2000 mg/kg im Menschen^{79,80}. Die Löslichkeit von CFX liegt bei neutralem pH-Wert bei 420 µM. Im basischen wie im sauren pH-Bereich steigt die Löslichkeit um den Faktor 100 an⁸¹. Des Weiteren besitzt CFX eine gewisse Affinität zu Nukleinsäuren, die aus Studien zu dessen Funktion als Gyrasehemmer ersichtlich wurde⁸². Zusätzlich erleichtern die Fluoreszenzeigenschaften von CFX dessen Verwendung, Nachweis und die Bestimmung von Bindeeigenschaften potentieller CFX-bindender Aptamere (CFX-Fluoreszenzspektrum im Anhang in Abbildung 6.1).

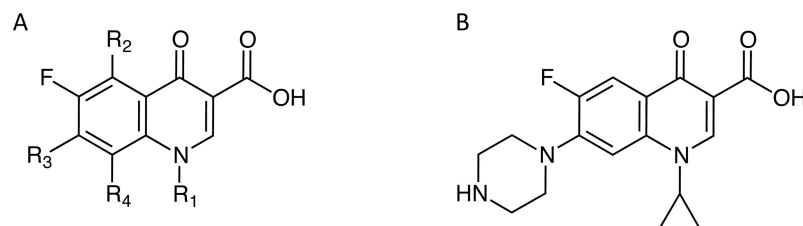


Abbildung 2.5 Chemische Grundstruktur der Fluorchinolone und von Ciprofloxacin.

A. Grundstruktur der Fluorchinolone. Alle Fluorchinolone teilen ein gemeinsames Grundgerüst aus einer 1-Alkyl-substituierten 4-Pyridon-3-carbonsäure, welche an Position 6 ein Fluor trägt. Der Substituent an Position R₁ ist ein Alkylrest, an Position R₃ sitzt meist ein Piperazinring. **B.** Chemische Struktur von CFX. R₁ = Cyclopropylrest, R₂ = H, R₃ = Piperazinring, R₄ = H. Das Fluoratom und der Piperazinylrest tragen zur günstigen Pharmakokinetik und zu einem breiten Wirkspektrum, das auch grampositive Erreger umfasst, bei⁷⁹.

2.7 Das TetR-bindende Aptamer

2.7.1 Eigenschaften des Tet-Repressors

Der Tet-Repressor (TetR) kontrolliert in Bakterien die Transkription von Tetracyclin-Resistenzgenen. In Abwesenheit des Induktors bindet er den Tet-Operator *tetO* als 46,6 kDa schweres Homodimer und blockiert so die Genexpression⁸³. Ist Tc anwesend, bindet es im Komplex mit Mg²⁺ TetR. Dies führt zu einer Konformationsänderung innerhalb von TetR und die Affinität zum Operator nimmt ab. Infolgedessen löst sich das TetR-Homodimer vom Operator und die Expression der

nachgeschalteten Gene führt zur Ausbildung der Resistenz, meist durch den aktiven Export von Tc aus der Zelle. Dies wiederum zieht eine Abschaltung der Gene durch Bindung von freien TetR an den Operator nach sich. Dieses Regulationsnetzwerk beruht auf (a) der hohen Affinität von TetR zum Operator *tetO* und dem Induktor Tc, (b) der niedrigen Affinität von Tc-gebundenem TetR zu *tetO* und (c) starker, aber kurzzeitiger Expression der Resistenzgene. Die Affinität von Tc, Doxycyclin (Dox) und Anhydrotetracyclin (Abbildung 2.6) ist im Komplex mit Magnesiumionen mit Assoziationskonstanten von 10^9 M, 10^{10} M und 10^{11} M außerordentlich affin und $10^3 - 10^5$ -fach stärker als die Affinität der Antibiotika zu ihrem zellulären Ziel, dem Ribosom. Bindung von zwei Molekülen $[Tc \cdot Mg]^+$ an ein Homodimer TetR reduziert die Affinität zum Operator um neun Größenordnungen⁸³.

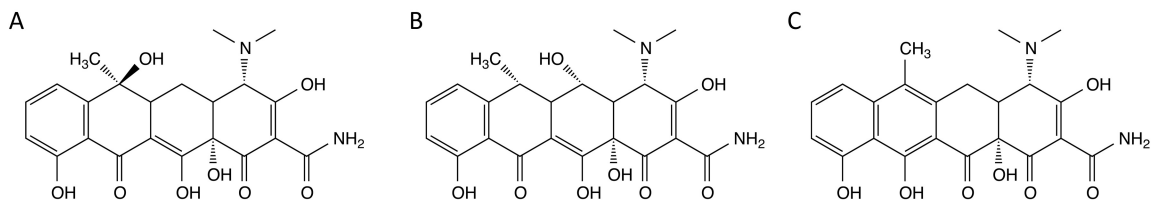


Abbildung 2.6 Chemische Struktur der in eukaryotischen Genregulationssystemen verwendeter Tetracycline.

A. Struktur von Tc B. Struktur von Dox C. Struktur von Anhydrotetracyclin. Entnommen aus⁸³.

Aus Röntgenstrukturanalysen von kristallisiertem TetR in An- und Abwesenheit von Tc ist die Konformationsänderung durch Tc-Bindung ersichtlich (Abbildung 2.7). Die DNA-Leseköpfe ($\alpha 1 - \alpha 3$) von TetR sind mit dem Proteinkern über die Helix $\alpha 4$ verbunden. Die Bindung von $[Tc \cdot Mg]^+$ an TetR entwindet die C-terminalen Aminosäurereste von Helix $\alpha 6$, welche Helix $\alpha 4$ verdrängen. Dies führt zu einem pendelähnlichen Schwingen der Helix $\alpha 4$ und vergrößert die Distanz zwischen den DNA-Leseköpfen um 3 Angström (Å), was zum Verlust der DNA-Bindung führt⁸³.

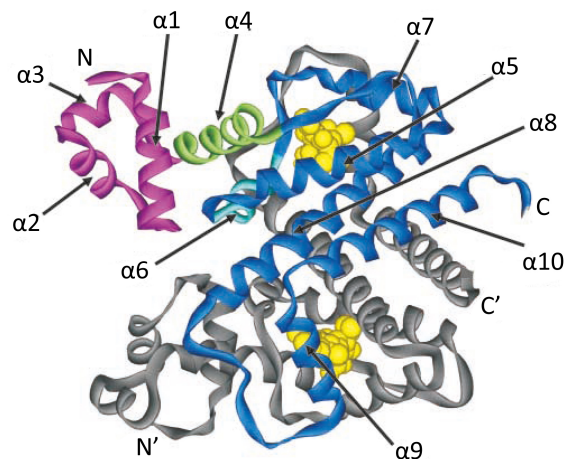


Abbildung 2.7 Kristallstruktur von TetR.

TetR ist als Bändermodell dargestellt. Ein Monomer in grau, das andere mit folgendem Farbkode: DNA-Bindekopf in magenta, die Verbindungshelix zum Proteinkern in grün und der Proteinkern mit Helix $\alpha 6$ in dunkel- und hellblau. Tc ist in gelb eingezeichnet. Die jeweiligen N- und C-Termini sind markiert (entnommen aus⁸³).

Tetracycline sind in ihrer ungeladenen Form in der Lage, ohne die Hilfe von Proteinkanälen frei über Lipiddoppelmembranen zu diffundieren. Tc liegt im Medium in ungeladener Form vor, aber auch in geladenen oder zwitterionischen Spezies (bedingt durch drei titrierbare Gruppen), abhängig vom pH-Wert⁸⁴. Die Aufnahme über die Lipiddoppelschicht beträgt bei *E. coli* $5,6 \times 10^{-9}$ cm/s. Dies entspricht einer Äquilierungszeit von ca. 35 min⁸⁵. Die gute

Aufnahme von Tetracyclinen über biologische Membranen sowie die hohe Affinität von Tc zu TetR und von TetR zum zugehörigen Operator macht dieses System ideal, um es in höheren Eukaryoten zur konditionalen Genregulation einzusetzen. Des Weiteren sind die Induktoren Tc und Dox gut charakterisiert, besitzen hervorragende pharmakokinetische Eigenschaften, sind zudem günstig und liefern hoch reproduzierbare Ergebnisse^{79,86}.

In den letzten 20 Jahren wurde das Tc-abhängige Genregulationssystem Tet-On/Tet-Off weitläufig in humanen Zellkulturen, aber auch in transgenen Organismen wie Pflanzen, Hefe, Protozoen, Fliegen und Nagern eingesetzt (Abbildung 2.8)⁸³.

Das Tet-On-System basiert auf der Fusion von TetR mit der VP16-Aktivator-domäne des *Herpes simplex*-Virus⁸⁷. Durch Hinzufügen dieser Domäne zu TetR und Platzierung des Tet-Operators stromaufwärts eines Promotors kann dieses System genutzt werden um die Genexpression der nachgeschalteten Gene zu stimulieren. Das entstandene hybride Protein ist unter dem Namen Tc-kontrollierter Transaktivator (tTA) bekannt. Das Tet-Off-System basiert auf den gleichen Grundlagen, nur wurde hier TetR durch den reversen Tet-Repressor (RevTetR oder rTetR) ausgetauscht⁸⁸. Durch Mutation von bis zu fünf Aminosäuren innerhalb von TetR konnte ein reverser Phänotyp erzeugt werden, der sich durch seine Eigenschaften günstig für das System auswirkte. Um generell einen reversen Phänotyp zu erzeugen, ist die Punktmutation L17G allerdings ausreichend⁸⁹. Die Bindung an den Tet-Operator erfolgt bei rTetR in Anwesenheit von Tetracyclinen (Tet-Off). Das entstandene hybride Protein wird rtTA genannt.

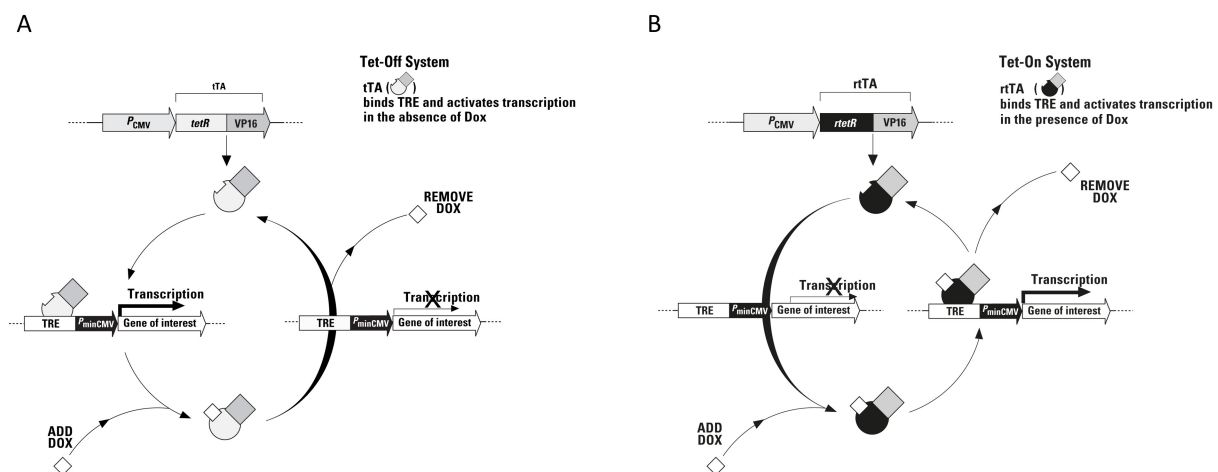


Abbildung 2.8 Schema der Genregulation im Tet-On- bzw. Tet-Off-System.

In beiden Systemen ist ein Element, welches die TetR-Bindestelle (*Tet responsive element*, TRE) in mehrfacher Kopie enthält, vor einem minimalen CMV-Promotor vorhanden. Auf den Promotor folgend, liegt das „Gen-von-Interesse“ (*gene of interest*), das kontrolliert werden soll. **A.** Im Tet-Off-System bindet tTA in Abwesenheit von Dox an das TRE und fördert die Transkription. Nach Zugabe von Dox löst sich dieser von der Promotorregion ab und die Transkription kommt zum Erliegen. **B.** Im Tet-On-System kommt die TetR-Variante mit umgekehrtem Verhalten bezüglich Dox zum Einsatz. Hier bewirkt die Bindung von Dox eine Anlagerung ans TRE und löst so in Gegenwart von Dox die Transkription des Gen-von-Interesses aus. Entnommen aus⁸⁶.

2.7.2 Eigenschaften des TetR-bindenden Aptamers

Durch kombinierte *in vitro*- und *in vivo*-Selektion wurde ein TetR-bindendes Aptamer gefunden, welches in der Zelle mit der Operatorbindung von TetR konkurrieren kann. Der Ablauf der Selektion gestaltete sich wie folgt: Nach zwölf Runden

automatisierter *in vitro*-Selektion (in Kooperation mit der Firma Nascacell) wurde ein angereicherter RNA-Pool gegen TetR gewonnen⁹⁰. Dieser wurde plasmidständig in *E. coli* unter dem P_{tac} -Promotor exprimiert und zwar bei gleichzeitiger Expression von TetR. Der exprimierte RNA-Pool bestand aus dem 50-nt langen randomisierten Kernbereich und den flankierenden konstanten Regionen, die für die *in vitro*-Selektion notwendig waren. Die Stabilität der Aptamersequenzen wurde durch Anfügen von Stammschleifenstrukturen 5'- und 3'-wärts erhöht. Der verwendete *E. coli*-Stamm WH207($\lambda tet50$) besaß eine chromosomal inserierte *tetA::lacZ*-Fusion, sodass die Expression des LacZ-Gens durch die Aktivität der β -Galaktosidase nachverfolgt werden konnte. Die exprimierten Aptamere wurden auf Konkurrenz mit der Operatorbindung von TetR selektiert (Abbildung 2.9 A). Dies hatte zur Folge, dass die gewonnenen Aptamere mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Nähe der DNA-Bindeköpfe binden. Gleichzeitig mussten die Bindekonstanten der gewonnenen Aptamere identisch oder besser sein, als die der TetR-*tetO*-Wechselwirkung ($K_D = 17,5 \text{ nM}$), damit in der Konkurrenzsituation das Aptamer TetR vom Operator wegtitrieren kann, um somit die Expression der β -Galaktosidase zu ermöglichen⁹¹.

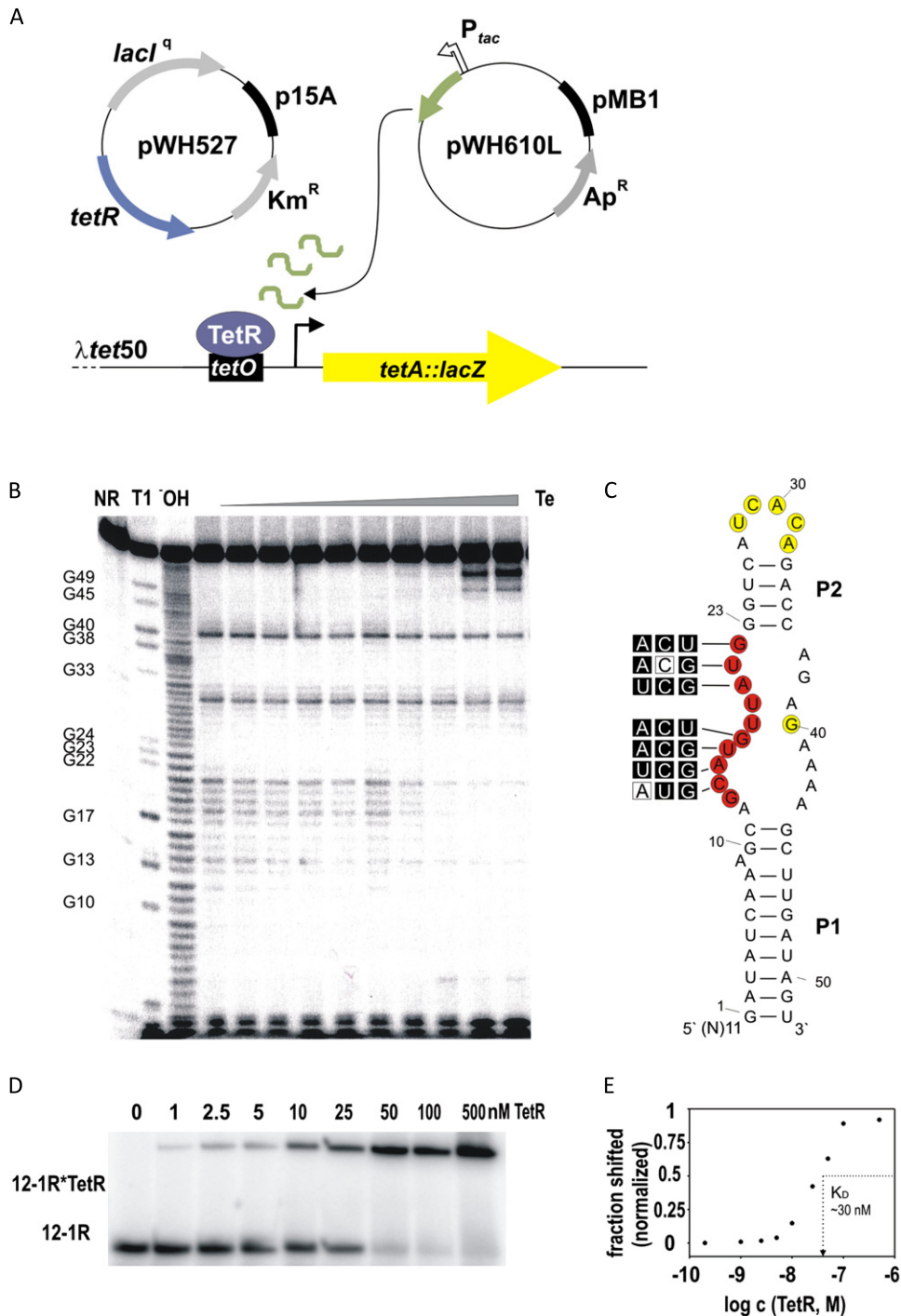


Abbildung 2.9 In vitro-Selektion der TetR-Aptamers und Identifikation der Proteinbindestelle.

A. Das *in vivo*-Screening wurde im *E. coli*-Stamm WH207(λ tet50) durchgeführt. Dieser enthielt das *lacZ*-Gen unter der Kontrolle von TetR. Das Plasmid pWH527 exprimiert TetR und LacI konstitutiv. TetR (blaues Oval) kontrolliert die Transkription von *lacZ*. Das Aptamer-exprimierende Plasmid pWH610L kodiert für das Aptamer (grün) unter der Kontrolle von IPTG/LacI durch den P_{tac} -Promotor. Die Resistenzgene und Replikationsursprünge der Plasmide sind angegeben. **B.** *In-line probing*-Experiment des TetR-Aptamers mit steigenden Konzentrationen TetR. 5'- 32 P-markierte RNA wurde nach partiellem Verdau mit RNase T1 (T1), Inkubation bei alkalischem pH-Wert (OH) und 40 h Inkubation mit einem TetR-Gradienten untersucht. NR steht für unbehandelte RNA (*no reaction*). Die Signale in der T1-Spur (G-spezifische Spaltung) zeigen die Nukleotidpositionen an. **C.** Modell der Sekundärstruktur des TetR-Aptamers. TetR-induzierte strukturelle Umlagerungen wurden über die Veränderung in der spontanen Spaltung identifiziert. Diese Nukleotide sind rot hinterlegt, während Nukleotide, die keine TetR-abhängige Veränderung zeigten, gelb hinterlegt sind. Das Ergebnis einer Sättigungsmutagenese der Nukleotide 14 – 17 und 20 – 22 ist auf der linken Seite der Struktur abgebildet. Mutationen, die zum Verlust der Aktivität führten, sind mit weißen Buchstaben in schwarzen Boxen dargestellt. **D.** Gelverzögerungsexperiment des TetR-Aptamers 12-1R mit steigenden Konzentrationen von TetR. 5'- 32 P-markierte RNA wurde mit steigenden Mengen an TetR inkubiert und die Komplexbildung wurde auf einem nativen 10% PAA-Gel verfolgt. **E.** Plot des Logarithmus der molaren Konzentration von TetR gegen die normalisierte, verzögerte Fraktion des Aptamer-TetR-Komplexes. Modifiziert nach⁹⁰.

Das aus der *in vivo*-Selektion hervorgegangene Aptamer (12-1) wurde auf ein Minimalmotiv reduziert. Es besteht aus einer Stammschleifenstruktur mit interner Schleife (P1 & P2, Abbildung 2.9 C). Die interne Schleife stellt das Bindemotiv für TetR dar und wurde durch Sättigungsmutagenese als sequenzinvariabel gezeigt, während die endständige Schleife sowie die Stämme in der Sequenz variabel sein können (Abbildung 2.9 B). Die Struktur wurde mittels *in-line probing*-Experimenten bestätigt und zeigte eine TetR-abhängige Abnahme an Spaltprodukten in der internen Schleife (Abbildung 2.9 C). Eine Optimierung zeigte, dass sowohl die Deletion eines ausgebulgten Nukleotids im unteren Stamm (A20), als auch eine Stabilisierung dieses Stammes durch GC-Basenpaare die Aktivität *in vivo* steigern konnte (bis zu einer Stammstabilität von ca. -30 kcal/mol). Eine weitere Stabilisierung des Stammes brachte keine Verbesserung des Aptamers. Über ein *EMSA*-Experiment konnte eine Dissoziationskonstante von ca. 30 nM abgeleitet werden (Abbildung 2.9 D und E).

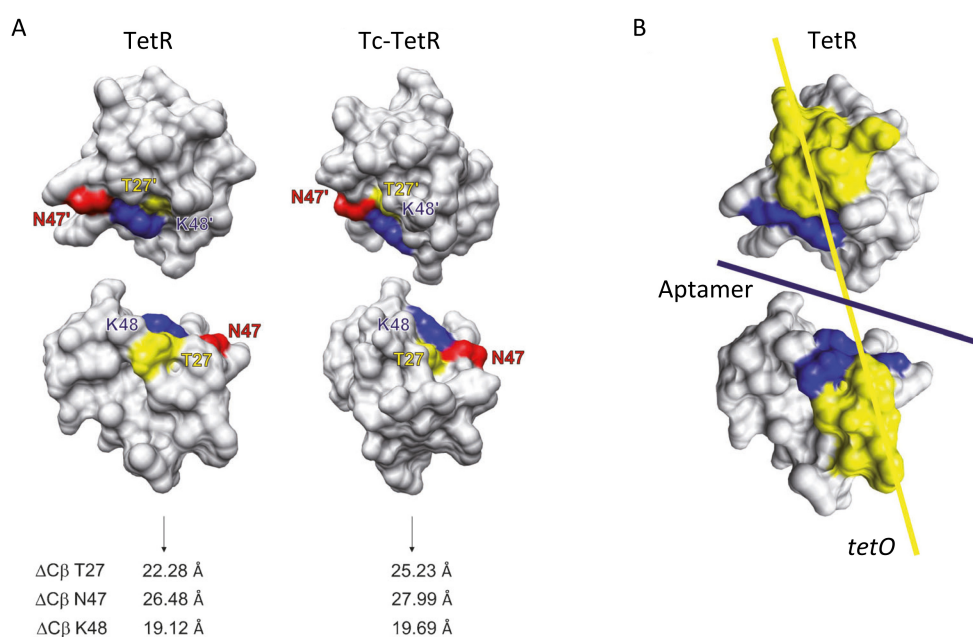


Abbildung 2.10 Ergebnisse der Mutationsanalyse von TetR.

A. Vergleich der DNA-Leseköpfe von TetR in der *tetO*-gebundenen Form (TetR) und der Tc-gebundenen Form (Tc-TetR). Gezeigt sind die ersten 55 Aminosäuren vom N-Terminus. Aminosäure T27, N47 und K48 sind farblich hervorgehoben. Die Abstände zwischen den entsprechenden C β -Atomen sind angegeben. **B.** Die DNA-Bindestelle auf TetR (Erkennungshelix $\alpha 3$, gelb) und das Epitop welches das TetR-Aptamer erkennt (blau) sind hervorgehoben. Entnommen aus⁹¹.

In weiteren Untersuchungen wurde die Assoziationskonstante auf $6,3 \times 10^7$ M bestimmt ($K_D = 16$ nM). Durch LILBID-Experimente konnte die Stöchiometrie von Aptamer zu TetR-Dimer mit 1:1 bestimmt werden. Mutationsstudien von TetR und die korrespondierenden *in vivo*-Aktivitäten konnten genutzt werden, um das Bindepitop des TetR-Aptamers zu bestimmen (Abbildung 2.10). Dieses überlappt zum Teil mit der Bindestelle des Operators und gibt eine Erklärung dafür, dass Aptamer und Operator gegenseitig kompetierbar sind. Neben der Kompetition konnte in weiteren *EMSA*-Experimenten auch eine aktive Verdrängung des Operators durch das TetR-Aptamer festgestellt werden⁹¹.

Die hohe Affinität des TetR-Aptamers zu TetR und die genaue Charakterisierung des Systems machten es idealen Komponenten zum Einsatz in der synthetischen Biologie.

2.7.3 Anwendungen des TetR-Aptamers

Während der *in vivo*-Selektion des TetR-Aptamers wurde dieses verwendet, um die Transkription des TetR-kontrollierten Reportergens LacZ zu regulieren⁹⁰. In einer parallel verlaufenden Selektion gegen TetR konnten Niles und Mitarbeiter das gleiche Aptamer selektieren. Das TetR-Aptamer-System fand in der Regulation der Translation des Reportergens Chloramphenicol-Transferase, welche eine Resistenz gegen Chloramphenicol vermittelt, Anwendung. Das TetR-Aptamer wurde vor die RBS gesetzt. In Abwesenheit von Anhydrotetracyclin wurde die Translation blockiert, was *E. coli* sensitiv gegenüber Chloramphenicol machte. Nach Zugabe von Anhydrotetracyclin bildete sich die Resistenz aus und bakterielles Wachstum war in Selektivmedium möglich. In einer weiteren Studie konnte das System auf *S. cerevisiae* übertragen werden^{92,93}.

Die Gruppe um Martin Fussenegger fusionierte das TetR-Aptamer über einen Linker an das Theophyllin-Aptamer. Durch Zugabe von Theophyllin wurde das TetR-Aptamer freigelegt und somit die Bindung an tTA ermöglicht⁹⁴. Durch die Bindung von tTA an das TetR-Aptamer und nicht mehr an das *Tet responsive element* (TRE) konnte die Genexpression der nachgeschalteten alkalischen Phosphatase (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, SEAP) reduziert werden (Abbildung 2.11).

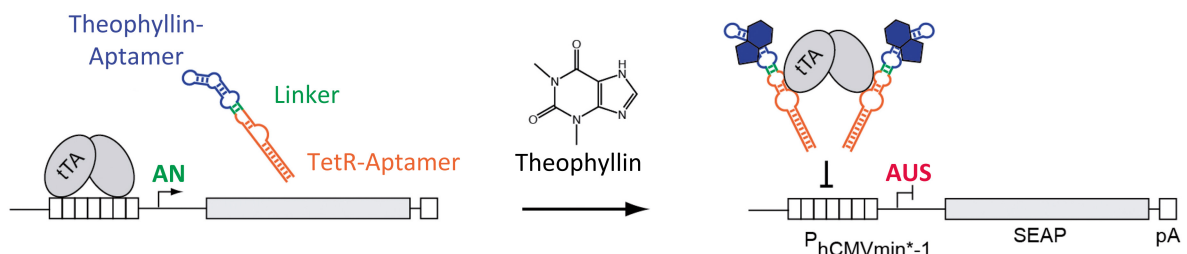


Abbildung 2.11 Mechanismus des Theophyllin-sensitiven TetR-Aptamers.

In Anwesenheit von Theophyllin faltet sich das Theophyllin-Aptamer um und gibt das TetR-Aptamer frei. Dies wiederum führt zur Bindung an tTA und verhindert so die Transkriptionsinitiation. $P_{hCMVmin^*-1}$ steht für den Tetracyclin-sensitiven Promotor, SEAP für die alkalische Phosphatase aus *Pandalus borealis*, pA für den Poly(A)-Schwanz der mRNA. Modifiziert nach⁹⁴.

2.8 Spleißen

Das Spleißen der prä-mRNA (zu engl. pre-mRNA, kurz für *precursor messenger RNA*) wird vom Spleißosom, einem Ribonucleoprotein-Komplex, katalysiert. Die Spleißreaktion umfasst zwei aufeinanderfolgende Transesterifikationen und entfernt dadurch das zwischen den Exons liegende Intron⁹⁵. Introns (*intervening regions*) sind nicht-codierende Sequenzabschnitte innerhalb eines Gens und müssen zur Herstellung der codierenden Sequenz entfernt werden. Die doppelte Transesterifikation geschieht in zwei Schritten (Abbildung 2.12). In Schritt 1 erfolgt ein nukleophiler Angriff der 5'SS durch die 2' OH-Gruppe des Adenosins des Verzweigungspunktes. Hierdurch wird das 5'-Ende des Introns an den Verzweigungspunkt ligiert und es entsteht eine Lariatstruktur. Im zweiten Schritt wird die 3'SS von der 3' OH-Gruppe der 5' Exons angegriffen, was zur Ligation beider Exons unter gleichzeitiger Freisetzung des Introns führt³.

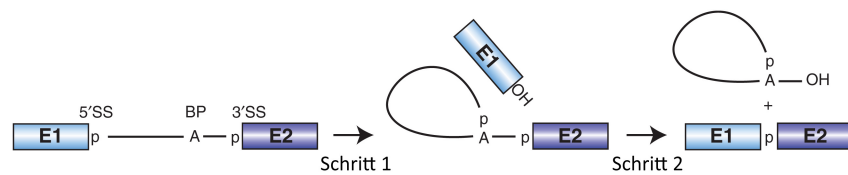


Abbildung 2.12 Schematische Darstellung der zwei Transesterifikationen während des Spleißens.

Die Boxen mit E1 und E2 stellen die flankierenden Exons dar, die dazwischenliegende Linie das Intron. Die für den Spleißprozess wichtigen Elemente sind angegeben: 5'-Spleißstelle (5'SS), Verzweigungspunkt (BP) und 3'-Spleißstelle (3'SS) sowie die freien Hydroxylgruppen (OH) und die Phosphat-Gruppe (p). Modifiziert nach³.

Das Spleißosom setzt sich aus einer Vielzahl von Faktoren zusammen, die in *trans* mit der prä-mRNA wechselwirken und die reaktiven Gruppen der prä-mRNA in räumliche Nähe bringen. Das Intron wird von den snRNPs U1, U2, U5 und U4/U6 und einigen nicht-snRNP-Proteinen gebunden. Jedes snRNP (*small nuclear ribonucleic protein*) besteht aus einer oder zwei snRNAs (*small nuclear ribonucleic acid*), je sieben Sm-Proteinen und einer variablen Anzahl weiterer Proteine, die für jedes snRNP spezifisch sind. Die Zusammenlagerung des Spleißosoms geschieht unter Interaktion der beteiligten snRNPs mit der prä-mRNA. Während des Spleißprozesses selbst finden größere Umlagerungen in der Struktur und Zusammensetzung des Spleißosoms statt (Abbildung 2.13).

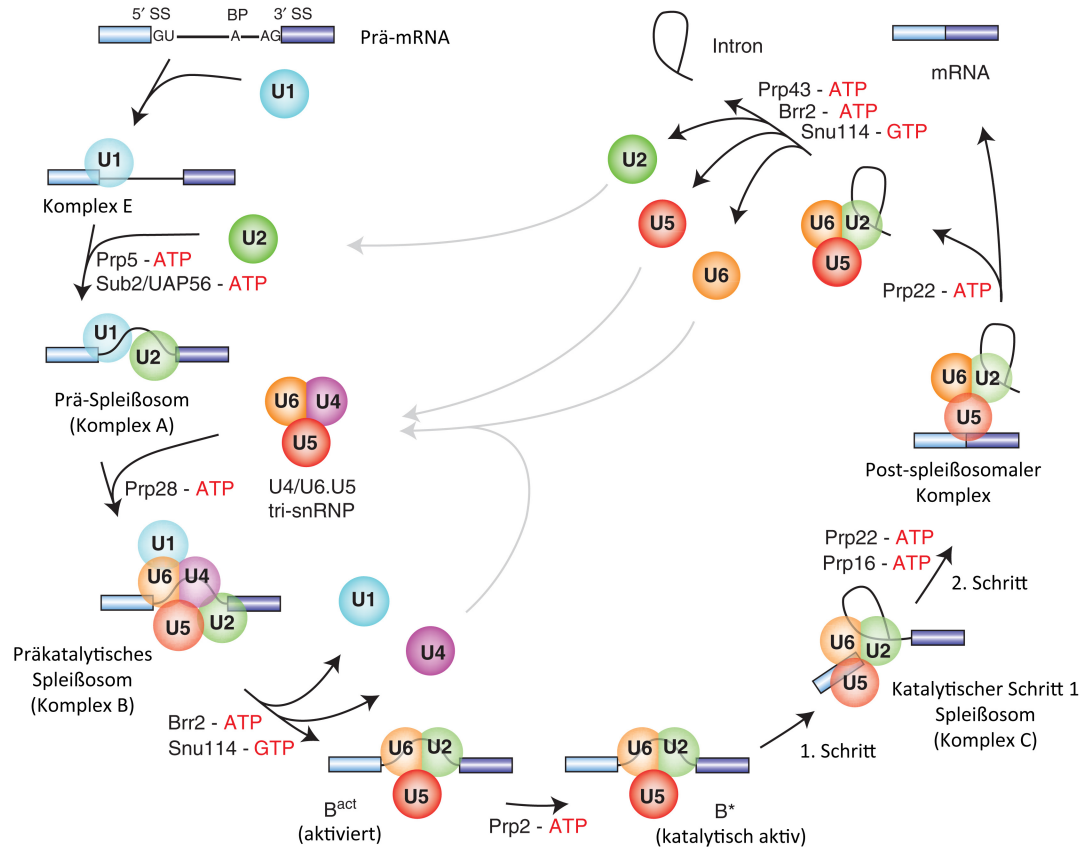


Abbildung 2.13 Schematische Darstellung des Zusammenbaus des Spleißosoms und Ablauf des Spleißens.

In dieser Darstellung sind der Einfachheit halber nur die snRNPs (Kreise) dargestellt. Die unterschiedlichen spleißosomalen Komplexe sind genannt, Exon und Introns sind als Boxen bzw. Linien dargestellt. Die ATP-abhängigen Enzyme sowie ATP (in roter Schrift) selbst, welche für die mannigfachen Umlagerungen des Spleißosoms verantwortlich sind, sind zur Veranschaulichung eingezeichnet. Modifiziert nach³.

Die Größe des Introns bestimmt, ob sich das Spleißosom am Intron zusammen lagert oder entlang des Exons. Bei kleinen Introns (kleiner ~250 bp) lagert sich das Spleißosom am Intron zusammen (Intron-Definition), bei größeren Introns, was bei den meisten eukaryotischen Genen der Fall ist, lagert sich das Spleißosom entlang den Exons zusammen (Exon-Definition). Bei kleinen Introns bindet im ersten Schritt das U1-snRNP über Basenpaarung seiner snRNA die 5'SS. BBP (*branch point binding protein*) und U2AF (*U2 auxiliary factor*) wechselwirken mit dem Verzweigungspunkt und dem Polypyrimidintrakt (Abbildung 2.14). Im nächsten Schritt bindet U2 den Verzweigungspunkt und formt den A-Komplex. Unter ATP-Verbrauch wird das vorassemblierte tri-snRNP-U4/U5/U6 rekrutiert (Komplex B). Nach Umlagerung und Abgang von U1 und U4 entsteht der aktivierte B-Komplex. Durch die Anlagerung der DEAH-box Helikase Prp2 entsteht der katalytisch aktive B*-Komplex, der den ersten Schritt der Katalyse vollzieht. Der entstandene Komplex C katalysiert die zweite Transesterifikation. Der postspleißosomale Komplex wird unter ATP-Verbrauch aufgelöst und recycelt^{3,96}.

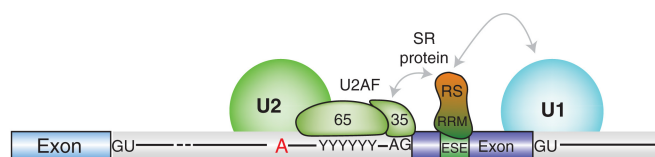


Abbildung 2.14 Modell der Interaktionen die während der Exon-Definition stattfinden.

Beschreibung siehe Fließtext. Entnommen aus³.

Bei größeren Introns wird das Modell der Exon-Definition angenommen. Hier bindet das U1-snRNP die 5'SS stromabwärts des Exons und fördert die Anlagerung von U2AF an die 3'SS. Danach wird U2 an den Verzweigungspunkt stromaufwärts des Exons rekrutiert. Im Folgenden binden SR-Proteine an spleißfördernde Sequenzen (*splice enhancer*) innerhalb des Exons, welche den exondefinierenden Komplex stabilisieren. Da die eigentliche Spleißreaktion das Intron einschließt, muss der Exondefinitions-komplex entfernt werden und in den Intron übergreifenden A-Komplex überführt werden^{3,96}. In Abbildung 2.15 sind Exon- und Intron-Definition vergleichend gegenübergestellt.

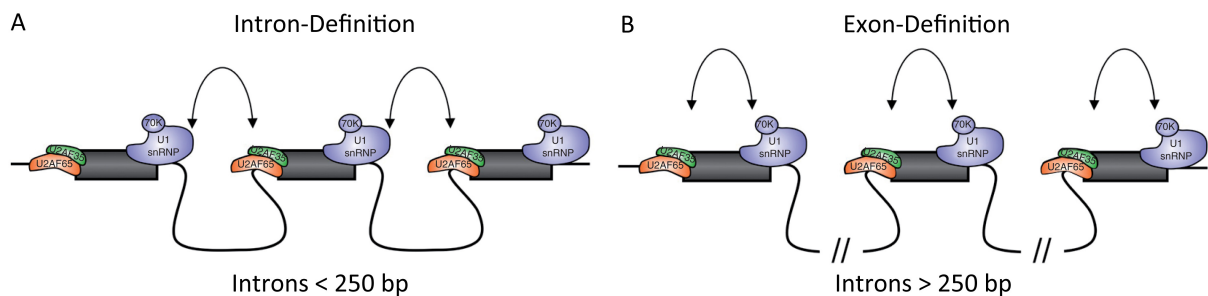


Abbildung 2.15 Modell der Intron- und Exon-Definition.

A. Modell der Intron-Definition, bei der die Spleißstellen eines Introns miteinander in Kontakt treten. **B.** Model der Exon-Definition, bei dem die Spleißstellen über die exonischen Sequenzen hinweg kommunizieren. Modifiziert nach⁹⁶.

Das Herausspleißen eines Introns ist kein alleinstehender Prozess. Damit gekoppelt sind weitere Prozesse, wie zum Beispiel Transkription und Polyadenylierung und im weiteren Verlauf auch der Export der gespleißten mRNA.

2.9 Alternatives Spleißen

Das Herausspleißen aller Introns, sodass Exon auf Exon folgt, entspricht der „Ein Gen ein Polypeptid“-Hypothese. Jedoch gibt es noch weitere Arten, wie Introns gespleißt werden können und wie somit die Abfolge der Exons in der fertig gespleißten mRNA beeinflusst wird. Diesen Prozess nennt man alternatives Spleißen (AS). AS von prä-mRNAs findet in ca. 95% der multi-exonischen Gene statt und trägt somit zur Proteindiversität bei⁹⁷. So kann durch AS die DNA-Bindung des Proteins moduliert, die Affinität von Proteinen zu bestimmten Liganden sowie die Proteinlokalisierung (Membranassoziation, Kompartimentierung bzw. Sekretion) verändert als auch die Stabilität von mRNAs beeinflusst werden⁹⁸. Die Fehlregulationen dieses Prozesses kann zu verschiedenen Krankheitsbildern führen (siehe unten). Die unterschiedlichen Arten von AS sind in Abbildung 2.16 zusammengefasst.

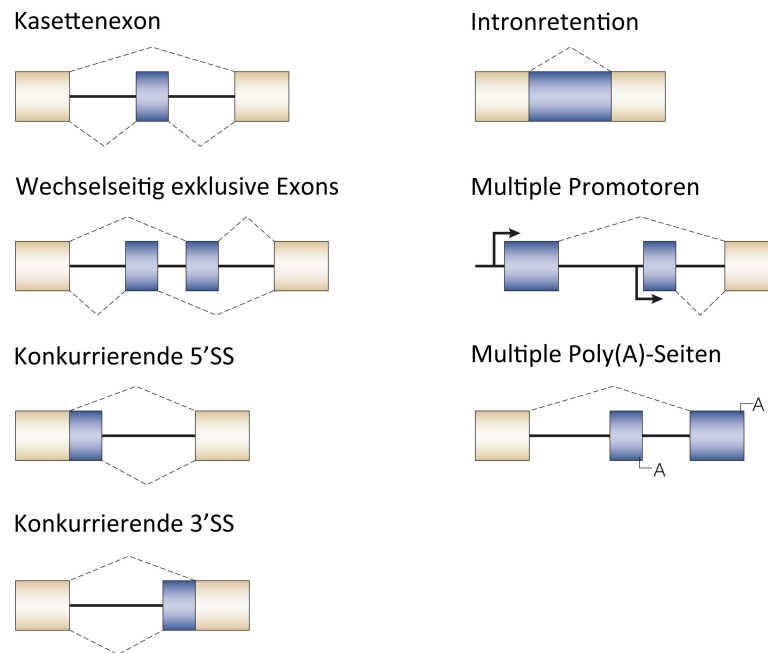


Abbildung 2.16 Übersicht über die verschiedenen Arten von alternativem Spleißen.

Kassettenexons (*cassette exons*) sind eigenständige Exons, die unabhängig voneinander in der fertig gespleißten mRNA sowohl inkludiert als auch exkludiert werden können. **Wechselseitig exklusive Exons** (*mutually exclusive exons*) besitzen nur eins von zwei zur Verfügung stehenden Exons in der fertigen mRNA. **Konkurrierende 5'SS und 3'SS** (*Competing 5'SS and 3'SS*) führen zu verlängerten bzw. verkürzten Exons und können nicht nur den Leserahmen verschieben, sondern auch proteinogene Nukleotide anfügen. **Intronretention** (*intron retention*) führt dazu, dass das entsprechende Intron Bestandteil der kodierenden Sequenz wird. **Multiple Promotoren** und **Multiple Poly(A)-Stellen** führen zwar zu unterschiedlichen Transkripten, geschehen aber nicht auf Ebene des Spleißens und sind nur der Vollständigkeit halber hier aufgelistet. Modifiziert nach⁹⁹.

Alternativ gespleißte Exons besitzen genau wie die konstitutiv gespleißten konservierte Bereiche. Sie weichen jedoch von den Konsensussequenzen ab, was in einer geringeren Affinität zum Spleißosom resultiert. Oft ist der Verzweigungspunkt in alternativ gespleißten Introns weiter stromaufwärts gelegen, als es in konstitutiv gespleißten Introns der Fall ist (von ca. 40 nt Abstand zur 3'SS bis zu 400 nt)¹⁰⁰. Damit die Zelle die richtigen Exons erkennt und spleißt, werden folglich weitere Faktoren benötigt. Diese bezeichnet man als Spleißenhancer und -silencer (*exon splice enhancer* und *silencer*, bzw. *intron splice enhancer* und *silencer*). Spleißsilencer sind zum Beispiel hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*), welche durch exonische oder intronische RNA-Sequenzen rekrutiert werden und spleißhemmende Wirkung haben. SR-Proteine wirken spleißfördernd auf das betreffende Exon (Spleißenhancer). Somit kann die Zelle durch differentielle Expression von spleißfördernden oder -hindernden Proteinen das Spleißmuster bestimmen. Verschiedene intra- und extrazelluläre Reize können so über die Spleißebene in eine veränderte Genexpression umgesetzt werden⁹⁸. Neben Proteinfaktoren, die durch bestimmte RNA-Elemente rekrutiert werden, beeinflusst auch die Sekundärstruktur der RNA maßgeblich die Wahl der Spleißstellen (*splice site selection*)¹⁰¹. Zwei gut untersuchte Beispiele sind die prä-mRNAs von DSCAM bzw. drei Gene in *Neurospora crassa*, die durch einen Thiamin-abhängigen Riboswitch gesteuert werden^{11,99}. Durch einen Anstieg von Thiamin in der Zelle verändert der Riboswitch seine Konformation, was zur Zugänglichkeit einer alternativen 5'SS führt.

Spleißen ist, wie die allermeisten zellulären Prozesse, auf höchste Präzision angewiesen. Abweichungen von nur einem Nukleotid kann das Genprodukt massiv verändern. Mindestens 15%, bei anderen Schätzungen bis zu 50%, aller menschlicher Krankheiten sollen von Missspleißen auf Grund von Punktmutationen in den Konsensussequenzen der

Spleißstellen herrühren¹⁰². Meist beruhen die ausgelösten Krankheiten auf einem Verlust der Proteinfunktion (*loss-of-function*). So wurden Veränderungen im AS in Krebszellen beobachtet. Hier werden neben Transkriptionsfaktoren auch Tyrosinkinase, welche an Signalkaskaden in der Zelle mitwirken, in ihrer Funktion verändert. Darüber hinaus sind Krebszellen auf eine anaerobe Glykolyse angewiesen, was durch eine Hochregulation der Expression der Pyruvat-Kinase ermöglicht wird. Weitere Mutationen im Zusammenhang mit Spleißen erleichtern das Überleben bei niedrigeren pH-Werten und Hypoxie⁹⁸.

Neben Krebs können Mutationen auch zur spinalen Muskelatrophie, Hypercholesterinämie, familiäre Dysautonomie und zur β -Thalassämie führen¹⁰³. Die spinale Muskelatrophie ist eine neurodegenerative Erkrankung, bei deren Verlauf es zu einem Verlust von Alpha-Motoneuronen im Rückenmark kommt. Hier führt eine Punktmutation in Exon 7 im *SMN2*-Gen zu dessen Ausschluss aus der fertig gespleißten mRNA. Die Hypercholesterinämie wird durch einen Ausschluss von Exon 12 im LDL-Rezeptor-Gen hervorgerufen und die familiäre Dysautonomie wird ausgelöst durch eine mutierte 5'SS des i-kappa-B Kinase-Komplex assoziierten Proteins. Die wohl bekannteste, durch Fehlregulation des Spleißens hervorgerufene Krankheit ist die β -Thalassämie, bei der die Menge an β -Globin reduziert ist, was zu einer Anämie führt. Über 100 Mutationen des β -Globin-Gens wurden beschrieben. Mehr als die Hälfte der Punktmutationen führt zu Veränderungen der 5'SS oder der 3'SS bzw. zur Aktivierung von kryptischen Spleißstellen innerhalb des Globin-Gens. In allen Fällen wird nicht-funktionales β -Globin produziert und die verminderte Menge an β -Globin führt zur Präzipitation der α -Ketten von Hämoglobin, was die Erythrozyten schädigt. Interessanterweise sind Individuen mit dieser Mutation weniger anfällig für Malaria^{98,103}. Die verschiedenen Mechanismen der veränderten Genfunktion durch Fehlspleißen sind in Abbildung 2.17 zusammengefasst.

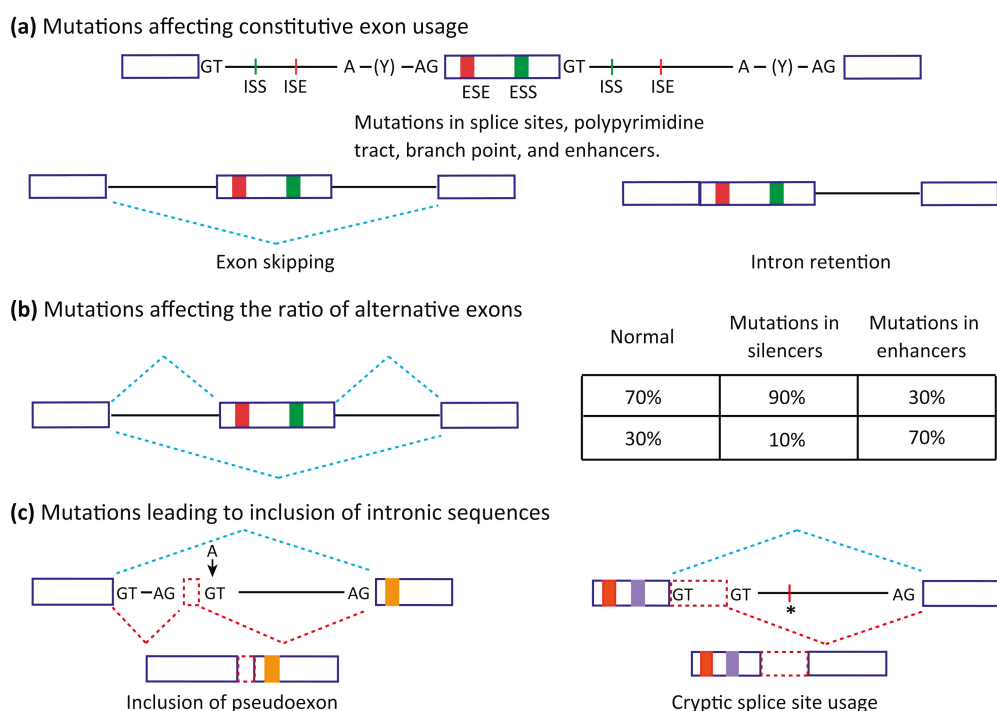


Abbildung 2.17 Spleißmutationen und veränderte Genfunktion.

A. Dargestellt sind Exons und Introns (Boxen bzw. Linien) und die für den Spleißvorgang wichtigen Sequenzen: 5'SS, 3'SS, Verzweigungspunkt und Polypyrimidintrakt (GT, AG, A bzw. (Y) in der Abbildung). Zusätzlich sind noch exon/intron splice enhancer und silencer (ESE, ESS, ISE, ISS) eingezeichnet. Mutation einer der genannten Sequenzelemente führt zu entweder Ausschluss eines Exons oder Retention eines Introns. **B.** Mutationen in splice enhancer- oder silencer-Elementen kann das Verhältnis von Spleiß-Isoformen zueinander verschieben. **C.** Mutationen innerhalb von Introns führen zur Inklusion desselben und Erzeugen Pseudo-Exon oder aktivieren

kryptische Spleißstellen (blau-gepunktete Linie: normales Spleißmuster; rot-gepunktete Linie: durch Mutation hervorgerufenen Spleißmuster). Modifiziert nach¹⁰⁴.

2.10 Zielsetzung dieser Studie

In den letzten Jahrzehnten wurde eine Reihe von RNA-Aptameren gegen kleine organische Moleküle selektiert. Davon waren jedoch nur wenige als Sensordomänen in Riboswitchen nutzbar. Um in der synthetischen Biologie die Nachfrage nach immer größeren und komplexeren Schaltkreisen zu erfüllen, muss der Werkzeugkasten der synthetischen Biologen erweitert werden. Aus diesem Grund soll in dieser Studie ein neues RNA-Aptamer gegen Ciprofloxacin selektiert werden, welches in Riboswitchen in höheren Eukaryoten angewendet werden kann. Hierfür sollte die für Protein-Selektion eingesetzte, auf Streptavidin-beschichteten paramagnetischen *beads*-basierende Methode für niedermolekulare Substanzen adaptiert und etabliert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte das TetR-Aptamer zur Kontrolle der Intronretention eingesetzt werden. Bisherige Systeme der Kontrolle dieser Spleißregulation sind nur *in vitro* sowie in dem niederen Eukaryonten *Saccharomyces cerevisiae* realisiert worden. Ziel dieser Arbeit war es, ein System aufzubauen, das in höheren Eukaryoten anwendbar ist. Hierzu sollte eine definierte Regulationskassette aufgebaut werden, die problemlos in andere Systeme übertragbar ist. Unter Verwendung des TetR-Aptamers und eines kleinen definierten Introns soll somit ein Riboregulator entworfen und systematisch im Reportersystem untersucht werden, von welchem klare Regeln für dessen Verwendung und Übertragbarkeit abgeleitet werden können. Der generierte Riboregulator könnte zudem auch helfen, die Grundlagen von alternativem Spleißen in Zukunft besser verstehen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der *in vitro*-Selektion gegen Ciprofloxacin

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte (Kapitel 3.1 und 3.2). Im ersten Abschnitt wird die *in vitro*-Selektion von RNA-Aptameren gegen das Antibiotikum Ciprofloxacin beschrieben werden. Dieser Teil beschreibt die Immobilisierung von Ciprofloxacin, den Verlauf der Selektion und die anschließende Charakterisierung des Pools sowie einzelner RNA-Moleküle.

3.1.1 Toxizität von Ciprofloxacin

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, zeichnet sich Ciprofloxacin (CFX) durch günstige Eigenschaften, welche bei *in vitro*-Selektionen von Vorteil sind, aus. Allen voran steht die gute pharmakologische Charakterisierung⁷⁹, das planare starre Grundgerüst, die gute Löslichkeit, die fluoreszenten Eigenschaften, die Grundaffinität zu Nukleinsäuren und die geringe Toxizität (Kapitel 2.6.1). Zur Toxizität von CFX liegen bereits Daten für verschiedene Zelllinien vor⁷⁸. Sie sollte hier unter den Bedingungen und mit der Zelllinie bestimmt werden, die letztendlich bei der Entwicklung eines CFX-Riboswitch zur der Anwendung kommen würde.

Hierfür wurden HeLa-Zellen in 96-well Platten zu 5000 Zellen/Vertiefung ausgesät und 24 h später mit einem CFX-Konzentrationsgradienten behandelt. Das Medium wurde mit der entsprechenden Menge CFX aus einer 1000x konzentrierten Stammlösung versetzt, sodass keine Verdünnungseffekte des Mediums entstehen. Nach 24 bzw. 48 h wurde der Viabilitätstest alamarBlue (Kapitel 5.2.2.4) durchgeführt. Der 100%-Wert ergab sich aus der Viabilität unbehandelter HeLa-Zellen, der 0%-Wert aus mit 10 μ M Taxol (Paclitaxel) behandelten Zellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 zu sehen.

Die Viabilität von HeLa-Zellen nimmt wie erwartet mit steigender CFX-Konzentration ab. Während Konzentrationen von 100 μ M sowohl nach 24 als auch nach 48 h keinen Einfluss auf die Viabilität zeigten, sinken die Werte bei 1 mM auf ca. 55% ab und erreichen bei 5 und 10 mM mit ca. 10% ihren Tiefpunkt. Die berechneten mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) ergeben für 24-stündiger Inkubation einen Wert von 1,27 mM und für 48-stündige Inkubation einen Wert von 853 μ M. Dies entspricht den Werten, die in der Literatur zu finden sind⁷⁸.

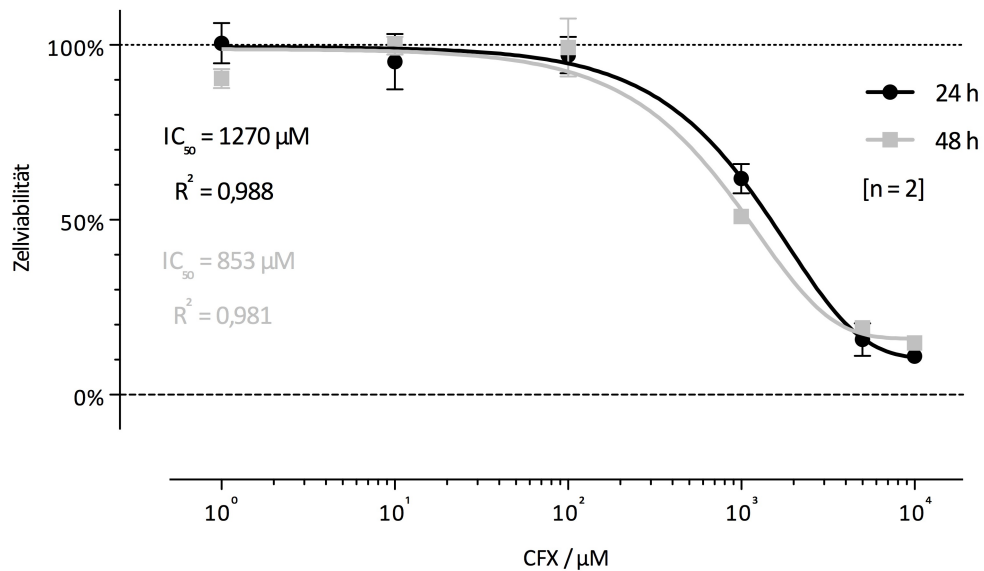


Abbildung 3.1 Einfluss von CFX auf die Viabilität von HeLa-Zellen.

Gezeigt sind die Ergebnisse des Viabilitätstest, um den Effekt von CFX auf HeLa-Zellen nach 24 (schwarze Linie) bzw. 48 h (graue Linie) zu zeigen. Das Medium wurde mit verschiedenen Konzentrationen von CFX versetzt, der 100%-Wert ergab sich aus unbehandelten, der 0%-Wert aus mit 10 μM Taxol behandelten HeLa-Zellen (gepunktete Linien). Die Zellen wurden 24 h nach Aussäen mit CFX bzw. Taxol behandelt und für weiter 24 bzw. 48 h inkubiert bis die Viabilität durch den alamarBlue-Viabilitätstest bestimmt wurde. Die erhaltenen Zellviabilitätswerte wurden mit der Exponentialfunktion $V(x) = V_0 \cdot e^{(-K \cdot x)}$ gefittet, wobei V_0 die Viabilität unbehandelter Zellen und $-K$ die Ratenkonstante ist, welche die Viabilität V zu jeder Konzentration x gibt. Aus dem Kurvenverlauf wurde die mittlere inhibitorische Konzentrationen (IC₅₀) ermittelt, die nach 24 h Behandlung bei 1,3 mM und nach 48 h bei 853 μM liegt. Die gezeigten Mittelwerte mit Standardabweichungen ergaben sich aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Zellgängigkeit von Ciprofloxacin

Im nächsten Schritt wurde die Zellgängigkeit von CFX überprüft. Hierfür wurden HeLa-Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät und am Folgetag mit 100 µM CFX behandelt. Nach 48-stündiger Inkubation der Zellen (100% Konfluenz) wurden diese zweimal mit 1x PBS gewaschen in 5 ml Lyse-Puffer (ohne PIC) aufgenommen. Das Lysat wurde zentrifugiert und der klare Überstand wurde im Fluoreszenzspektrometer vermessen auf CFX-Fluoreszenz (Anregung bei 335 nm mit Spaltgröße 1 nm, Emission von 360 – 600 nm (420 nm zur Auswertung) mit Spaltgröße 1 nm, Integrationszeit 0,2s). Als Referenz dienten HeLa-Zellen, welche nicht mit CFX behandelt wurden und eine 1 µM CFX-Lösung in Lyse-Puffer. Der durch den Lyse-Puffer verursachte Hintergrund an Fluoreszenz wurde jeweils von allen Werten subtrahiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.2 zu finden.

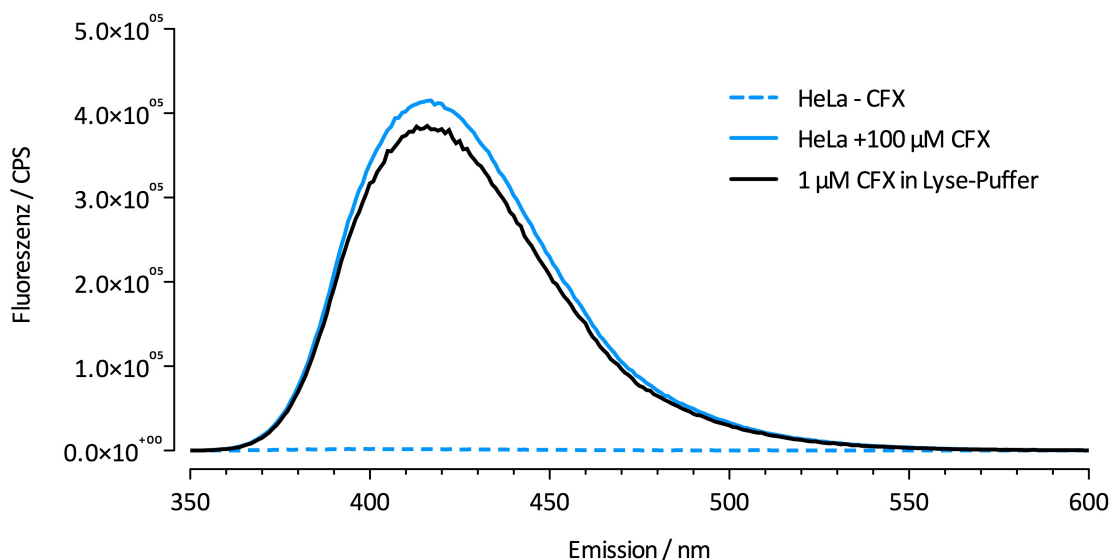


Abbildung 3.2 Zellgängigkeit von Ciprofloxacin.

Abgebildet sind die Emissionsspektren lysierter HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden mit 100 µM CFX behandelt und 24 h inkubiert (HeLa +100 µM CFX). Nach Inkubation wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Das Zelllysate wurde nach Zentrifugation und Entfernen der Zelltrümmer im Fluoreszenzspektrometer vermessen. Als Referenz diente 1 µM CFX in Lyse-Puffer. Der Hintergrund, der durch den Lyse-Puffer erzeugt wurde, wurde von jedem Messwert subtrahiert. Die Daten wurden mit folgenden Einstellungen am Fluoreszenzspektrometer aufgenommen: Anregung bei 335 nm mit Spaltgröße 1 nm, Emission von 360 – 600 nm (420 nm zur Auswertung verwendet) mit Spaltgröße 1 nm, Integrationszeit 0,2s. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten.

Im Lysat der mit 100 µM CFX behandelten HeLa-Zellen ist ein starkes Fluoreszenzsignal zu detektieren, welche die gleichen Charakteristika zeigt wie die Referenzlösung von 1 µM CFX in Lyse-Puffer. Da die Zellen in einer 75 cm²-Flasche bis zur hundertprozentigen Konfluenz kultiviert wurden, ergibt sich unter der Annahme einer mittleren Zellfläche von 370 µm² und einem mittleren Zellvolumen von 5000 µm³ eine Zellzahl von $20,3 \times 10^6$ HeLa-Zellen mit einem totalen Zellvolumen von $101,5 \mu\text{l}^{105}$. Dieses aufgenommen in 5 ml Lysepuffer ergibt einen Verdünnungsfaktor von ca. 50-fach. Vergleicht man dies mit dem Fluoreszenzwert von 1 µM CFX in Lysepuffer, so ergibt sich eine ca. 50 µM Konzentration von CFX in den mit 100 µM CFX-behandelten HeLa-Zellen.

3.1.3 Immobilisierung von Ciprofloxacin

Das Zielmolekül CFX musste für die Selektion immobilisiert werden. Da ein System verwendet werden sollte, das auf Streptavidin-beschichteten, paramagnetischen Kügelchen (*beads*) basierte, musste CFX biotinyliert werden. Die Vorteile dieses Systems im Vergleich zur klassischen *in vitro*-Selektion, bei welchem die Bindung säulenbasiert durchgeführt wird, lag darin, dass sowohl die Kopplung des Zielmoleküls als auch der Nachweis wesentlich schneller, effizienter und vorhersagbarer waren. Die Selektion selbst konnte durch dieses Verfahren von mehreren Tagen pro Runde auf mehrere Stunden verkürzt werden, was die Möglichkeit eröffnete, gewisse Selektionsrunden mehrmals zu wiederholen, bzw. die komplette Selektion unter anderen Bedingungen in einem überschaubaren Zeitraum zu wiederholen.

Die Biotinylierung wurde von Cem Özcoban aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alexander Heckel (Goethe-Universität) durchgeführt. CFX wurde mit Pentafluorophenyl-Biotin als Biotinylierungsreagenz in Dimethylformamid bei Raumtemperatur für 16 h inkubiert (Abbildung 3.3). Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch über eine Kieselgelsäule chromatographisch aufgetrennt und das Produkt durch NMR und Massenspektrometrie charakterisiert.

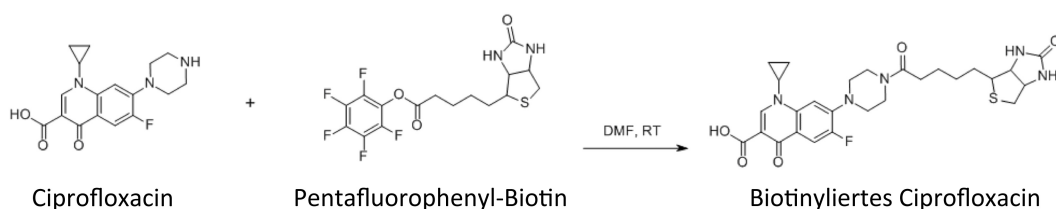


Abbildung 3.3 Syntheseweg der Biotinylierung von Ciprofloxacin.

Ciprofloxacin wurde mit Pentafluorophenyl-Biotin in Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur (RT) für 16 h inkubiert und anschließend über eine Kieselgelsäule chromatographisch aufgetrennt.

Zur Immobilisierung des biotinylierten CFX (bioCFX) wurde dieses mit Streptavidin-Dynabeads M-280 in PBS inkubiert. Hierfür wurden 5 mg Streptavidin-Dynabeads nach mehrmaligem Waschen mit 1x PBS in 500 µl 700 µM bioCFX resuspendiert und für 1h bei 37°C und 800 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die *beads* 3x mit Lagerungspuffer gewaschen und zu einer Endkonzentration von 3,33 µg/µl in Lagerungspuffer aufgenommen. Unter der Annahme, dass bioCFX sich ähnlich gut an Streptavidin koppeln lässt wie Biotin, wurde eine Ligandenkonzentration von 0,6 µM berechnet¹⁰⁶.

Zum qualitativen Nachweis der Kopplung von bioCFX an Streptavidin-Dynabeads wurde das FITC-Biotin-Assay verwendet. Hierbei wurden die bereits gekoppelten bioCFX-*beads* mit Biotin-4-Fluorescein (FITC-Biotin) inkubiert. Unbeladene Streptavidin-Moleküle sind in der Lage FITC-Biotin zu binden. Somit ist die gebundene Menge FITC-Biotin, bzw. die Fluoreszenzintensität umgekehrt proportional zur Kopplungseffizienz. Die mit FITC-Biotin inkubierten *beads* wurden mit 1x PBS gewaschen und im Anschluss durchflusszytometrisch vermessen. Die Fluoreszenzintensität/*Bead* gibt Aufschluss über die Qualität der Kopplung. Als Referenzwerte dienten nicht-gekoppelte und Biotin-gekoppelte Streptavidin-Dynabeads. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.4 zu finden.

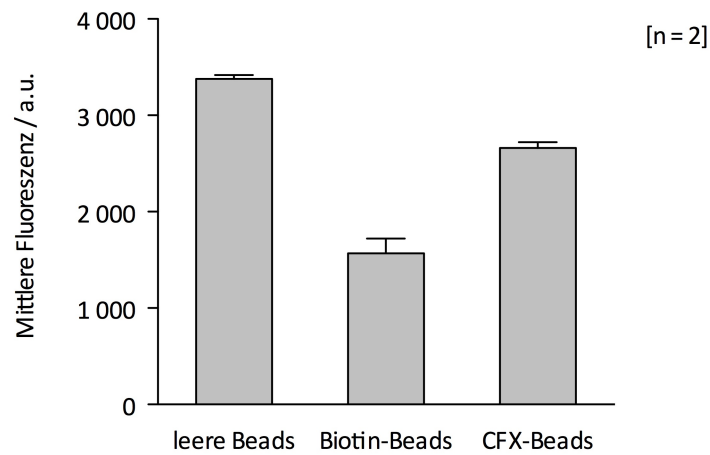


Abbildung 3.4 Qualitativer Nachweis der Immobilisierung von biotinyliertem Ciprofloxacin.

Die mit FITC-Biotin behandelten *beads* wurden am Durchflusszytometer (BD FACSARIA II) analysiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte der mittleren Fluoreszenz (*arbitrary units*, a.u.) mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

Für die Immobilisierung von bioCFX konnte im Vergleich zu leeren *beads* eine Abnahme der Fluoreszenz von 21% registriert werden. Biotin-gekoppelte *beads* senkten die Fluoreszenz um 54%. Die Effizienz der Bindung von bioCFX an die Streptavidin-*beads* wurde als ausreichend betrachtet.

3.1.4 In vitro-Selektion

Im Folgenden soll zuerst die SELEX-Strategie dargelegt werden: Der DNA-Ausgangspool wird über T7-Polymerase in den RNA-Ausgangspool transkribiert. Dieser wird zunächst mit leeren *beads* inkubiert um Matrix-bindende RNA-Moleküle aus dem Pool zu entfernen (negativ Selektion). Danach wird der Überstand mit Ligand-tragenden *beads* inkubiert. Nach Partitionierung in ungebundenen und gebundenen RNA-Moleküle durch verschiedene Waschschrte werden letztere durch Hitze von den *beads* eluiert. Die gewonnenen RNA-Moleküle werden über cDNA-Synthese und PCR (RT-PCR) amplifiziert und anschließend mittels T7-Polymerase transkribiert. Damit kann der Zyklus von vorn beginnen (Abbildung 3.5).

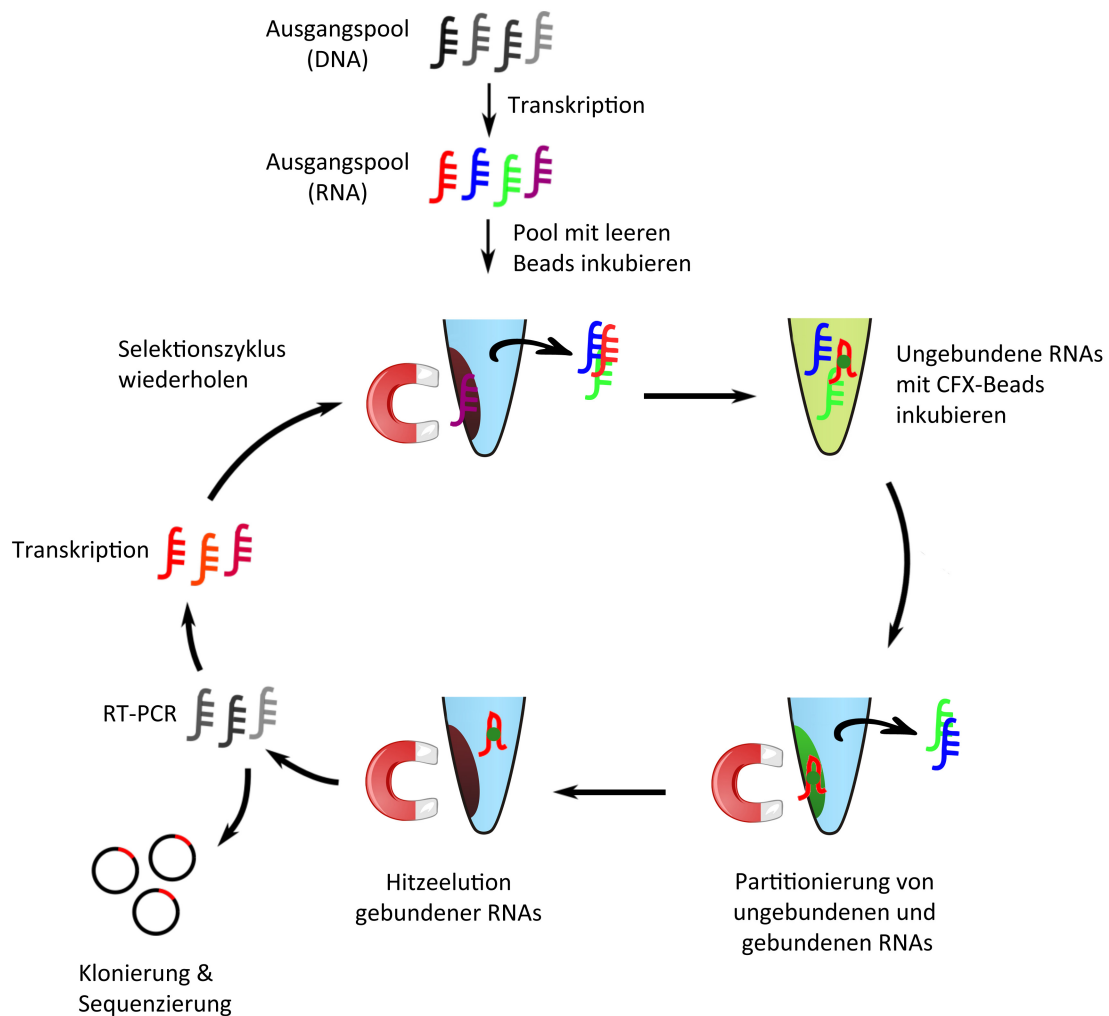


Abbildung 3.5 Schematischer Überblick über die SELEX-Strategie.

Weitere Beschreibung ist im Fließtext enthalten.

Der für die Selektion verwendete RNA-Ausgangspool bestand aus zwei endständigen, konstanten Bereichen, welche für die cDNA-Synthese und PCR-Amplifikation notwendig waren sowie einem randomisierten Kernbereich aus 50 Nukleotiden. Die konstanten Bereiche waren so gewählt, dass diese jeweils mit sich selbst schwache Wechselwirkungen über Basenpaarungen eingehen konnten und somit den randomisierten Kernbereich für die Interaktion mit dem Zielmolekül freigaben (Abbildung 3.6). Der RNA-Pool wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Günter Mayer (Universität Bonn) bereitgestellt.

A

ATAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGGGAAGTCTACATCTT - N₅₀ - TTTCTGGAGTTGACGAAGCTT

B

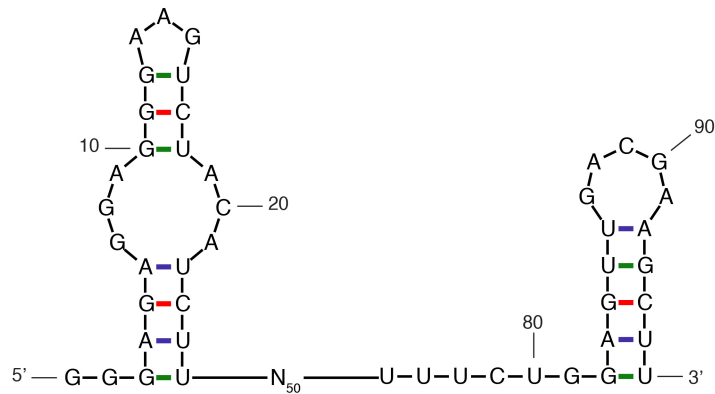


Abbildung 3.6 Pool-Design.

A. Sequenz des DNA-Pools. Grau: T7-Promotor, Schwarz: 5'- und 3'-konstante Region mit dazwischenliegender randomisierter Sequenz (N₅₀). Die beiden Pfeile geben die Bindestellen der Oligonukleotide an, mit der die RT-PCR durchgeführt wurden. **B.** Vorhersage der Sekundärstruktur des transkribierten RNA-Pools durch den Zuker-Algorithmus (mFold)¹⁰⁷.

In der ersten Runde der Selektion wurden 1 nmol RNA ($0,6 \times 10^{15}$ Moleküle) mit 80 µl leeren *beads* (266 µg *beads* in Lagerungspuffer), 3 mM MgCl₂ für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch gelegentliches Auf- und Abpipettieren wurden die *beads* am sedimentieren gehindert. Danach wurde die Suspension unter Verwendung eines magnetischen Reaktionsgefäßhalters (MagnaRack™, Invitrogen) in *beads* und Überstand getrennt. Der Überstand wurde für weitere 30 min bei 37°C mit bioCFX-*beads* (266 µg) inkubiert. Die Partitionierung gebundener und ungebundener RNA-Molekülen erfolgte mit dem magnetischen Reaktionsgefäßhalter. Nach dem Pelletieren der *beads* wurde der Überstand abgenommen und die *beads* in Selektionspuffer resuspendiert (= Waschschrift). Dieser Vorgang wurde in der ersten Runde nicht wiederholt. Nach der Resuspendierung wurden die magnetischen *beads* wieder mittels magnetischen Reaktionsgefäßhalters pelletiert und anschließend in Wasser aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation bei 80°C, welche die Bindung zwischen bioCFX und Streptavidin auflöste (Hitzeelution), wurde der Überstand für die RT-PCR eingesetzt (Kapitel 5.2.6)¹⁰⁸. Die Zyklenanzahl richtete sich nach der Produktentwicklung und war ein erstes Maß für die Anreicherung des selektierten RNA-Pools. Nach Amplifikation des in cDNA umgeschriebenen RNA-Pools wurde dieser durch T7-Polymerase wieder in RNA umgeschrieben und als Basis für die nächste Runde eingesetzt (Kapitel 5.2.5 und Tabelle 5.7). Hierfür wurden nun 20 µl Transkriptionsprodukt direkt zu 80 µl Bead-Suspension gegeben.

Im Verlauf der Selektion wurde die Stringenz (Anzahl der Waschschrte) kontinuierlich erhöht. Die benötigte Anzahl an PCR-Zyklen, um den Pool zu amplifizieren, stieg in den ersten Runden beiden Runden an, fiel dann aber bis Runde 7 auf einen Wert von 5 PCR-Zyklen ab, wohingegen die Anzahl der Waschschrte auf 12 gesteigert werden konnte (Abbildung 3.7).

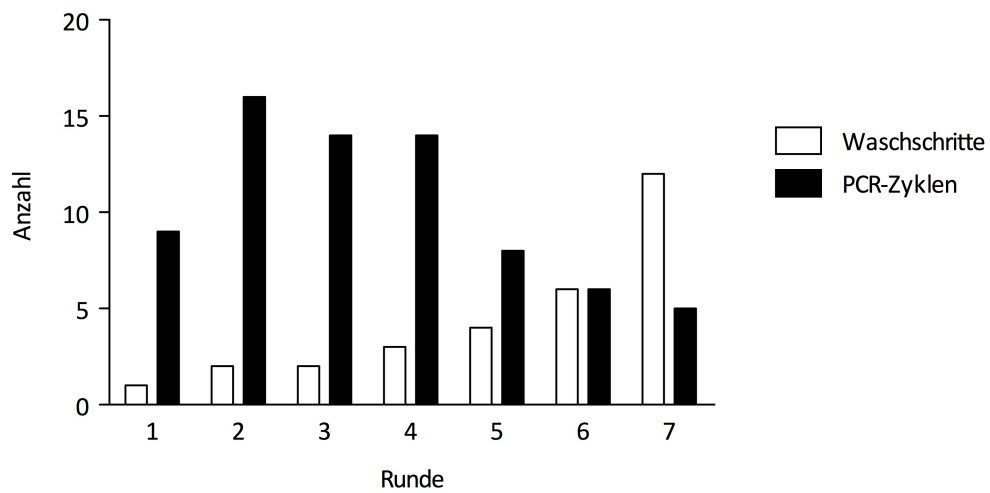


Abbildung 3.7 Verlauf der *in vitro*-Selektion gegen biotinyliertes Ciprofloxacin.

Gezeigt sind die einzelnen Runde der *in vitro*-Selektion gegen bioCFX mit der dazugehörigen Anzahl an Waschschrten (= Stringenz) sowie die benötigten PCR-Zyklen zur Produktformation. Während die Stringenz über den Verlauf der Selektion angehoben wurde, fiel die Anzahl der PCR-Zyklen ab Runde 2 kontinuierlich ab und erreichte nach insgesamt sieben Runden eine Tiefstand bei 5 Zyklen.

An diesem Punkt der Selektion wurde entschieden, den Pool zu charakterisieren.

3.1.5 Überprüfung des Selektionsfortschritts

Zur Überprüfung des Selektionsfortschritts und der Anreicherung bindender RNA-Moleküle wurden die Runden 1, 4 und 7 vom RT-PCR-Produkt radioaktiv transkribiert. Die radioaktiv-markierten Pools wurden mit bioCFX-*beads* bzw. leeren *beads* wie in der Selektion inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit Selektionspuffer eluiert. Alle anfallenden Fraktionen wurden auf 1 ml mit Wasser aufgefüllt und im Szintillationszähler vermessen. Die Fraktionen „Überstand“, „Waschfraktion 1“ und „Waschfraktion 2“ wurden der Übersicht halber zusammenfasst zu „ungebunden“, genauso wie „Elution“ und „*beads*“ zu „gebunden“ zusammengefasst wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

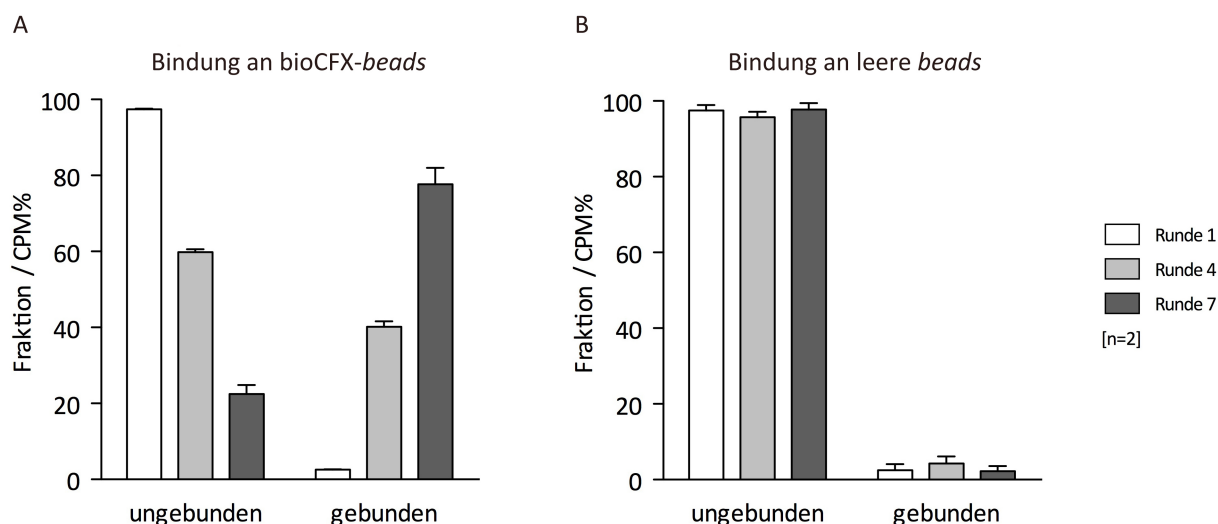


Abbildung 3.8 Charakterisierung der selektierten Pools aus Runde 1, 4 und 7.

A. Bindungsstudie mit den selektierten Pools aus den Runden 1, 4 und 7 auf bioCFX-*beads*. B. Bindungsstudie mit leeren *beads*. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Inkubation des Pools aus Runde 1 mit CFX-*beads* zeigte noch keine Bindung, während der Pool aus Runde 4 und 7 eine Zunahme der Bindung bis auf 77,6% zeigte. Die Inkubation mit leeren *beads* zeigte bei allen Pools keine Bindung (>95% Radioaktivität im Überstand). Auf Basis dieser Ergebnisse wurde entschieden, den Pool aus Runde 7 detaillierter zu untersuchen.

3.1.6 Charakterisierung der Einzelsequenzen

Nachdem der selektierte RNA-Pool aus Runde 7 hervorragende Bindeeigenschaften zeigte, wurde dieser in cDNA umgeschrieben und mittels PCR für 5 Runden amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde über das TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen) nach Herstellerangaben kloniert. Insgesamt wurden 24 Klone sequenziert und zuerst bioinformatisch, später molekularbiologisch untersucht.

Die Übersicht über die Häufigkeitsverteilung zeigte, dass die meisten Sequenzen einmal vorkamen, drei je zweimal und eine dreimal. Nach Vorhersage der Sekundärstruktur der randomisierten Kernbereiche mittels mFold (DotBracket-Notation in Tabelle 3.1) ergab sich für einen Großteil der Sequenzen jedoch eine ähnliche Sekundärstruktur, bestehend aus einer Stammschleife mit einem ausgebulgtem Guanin. Es ist festzuhalten, dass die Sequenzen der Nukleotide in der

Schleife identisch waren (GCAGGA). Auch konnte diese Sequenzabfolge in anderen Klonen gefunden werden, die keine übereinstimmende Vorhersage der Sekundärstruktur zeigten (unterstrichene Nukleotide in Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 Einzelsequenzen der Klone aus Pool Runde 7.

Klon	Sequenz (5'→3') und DotBracket-Notation	Häufigkeit ^a
CFX_K1	ACCTCTCACCTAAATGCCTCCTCGTACCACCAGAAGATGTGCAGGAACG ((((((.....))))))....	3
CFX_K2	AAATTCGCAATAATAGCTCCGCTGTGCAGGAACGGGGAGCACAGCTGCAT (((..... ((((((.....))))))))).....))..	1
CFX_K3	ACCCAGAAGCACGTCTTGTGCGCAGGAGCGGGAGGACAGAAGGCGGC ((. ((((((.....))))))))).....))....	1
CFX_K4	ATAACTGAATCGATATGGCAGTTGCTGCGCAGGAGCGGGACTACCGTAGG ((((((.....)))))).....))..	1
CFX_K5	ACGCGCTGTGCAGGAACGGGCGTAGGGACGCTCCAATCACCAGGCCTCCT (((..... (((.....))))))..... (((.....)))..	2
CFX_K6	GCGCTGCTGTGCAGGAACGGGGCGCAACGGTTTATAAGCAAAGCCATACC ((((..... (((.....))))))..... (((.....))).....	1
CFX_K7	CTATCTTTTATTCAAACCTGCTCCAAAAGGCAAGCGACTACCGTAGCCTT ((((((.....))))))..	1
CFX_K8	TTGTTCGGGCCATAGACTCTAAGGAAGCCGCTGTGCAGGAACGGGGCCTC (((..... (((.....)))))).....	1
CFX_K10	GATGTGCAGGAACGTAAGCGTGTAGTCATTCCGCCTATGGCAGCTAGTGG ((. ((((((.....)))))).....)).....	2
CFX_K11	GCCGAGCTAAAAACCCCTCTATCAATCGTGTGCGCAGGAGCGGGCGATT ... (((.....)))..... ((((((.....))))))..	1
CFX_K12	CGTGATCATGGTTCCGGAGGGAAGACCCCGTACGCAAGCCCACTACCTCC .. (((..... ((((((.....)))))).....)).....)).....	1
CFX_K14	GATTGACCCGATAAAAGACGAGGTATGGCGCGCAACAGCCTATCGGATCA ... (((..... ((((((.....)))))).....)).....))..	2
CFX_K16	TGACAAGCGCATGCATCTGTGGCCTCAGGAAGCGGGATGCGGTCCCA ((. ((((((.....)))))).....)).....	1
CFX_K17	ACAGGGACTGCTGCGCAGGAGCGGGGTCTCTGTTCTAACGTCGTCTCATA (((((((..... (((.....))))))))).....	1
CFX_K18	GACTCATGAATCAGATACGCTCCACGCCATCCACTCTACAACGACCCGCC (((..... (((.....)))))).....	1
CFX_K19	AAGGCCCAAGAGCATATGCCTCCCTGTTGCGCAGGAGCGAGGGGAGTG ... (((.....)))..... ((((((.....)))))).....	1
CFX_K21	GAAAGTTTACAACCTAGACCGGCAGATCTGCAGGAAGGTTGCCGATAGCG ... (((.....)))..... ((((((.....)))))).....	1
CFX_K22	ACCTCTCACCTAAGATGCCTCCTCGTACCACCAGAAGATGTGCAGGAACG ((((((.....))))))....	1
CFX_K23	CACAACTCAAACAGCCGTGATGTGCAGGAACGTGCGGCAAATAACCCTC ((((((.....)))))).....	1

Gegeben sind die Sequenzen der randomisierten Kernbereiche in 5'→3'-Notation mit zugehöriger Faltung in Dot-Bracket-Notation. Die unterstrichenen Nukleotide markieren die häufigste gefundene gemeinsame Sequenzabfolge.

^a Häufigkeit innerhalb der sequenzierten Klone.

Nach erneuter Faltung dieser RNAs mit den konstanten Regionen zeigten dann aber auch diese eine identische Faltung. In diesen Fällen hat der konstante Bereich des Pools nicht nur die Faltung unterstützt, sondern ist Bestandteil dessen. Basierend auf der identischen Faltung wurde anhand der Sequenz ein Konsensusmotiv erstellt (Abbildung 3.9).

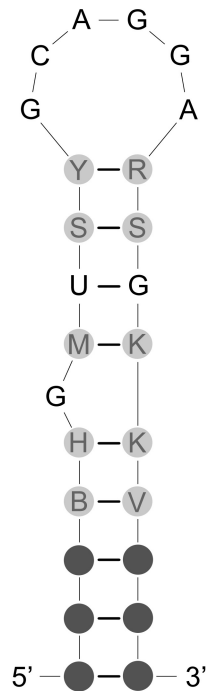


Abbildung 3.9 Konsensusmotiv innerhalb des Pools.

Das Konsensusmotiv wurde auf Basis der Sequenzen und Sekundärstrukturvorhersagen der Klone CFX_K1, _2, _3, _4, _5, _6, _8, _11, _17, _19, _21, _22 und _23 erstellt. Basen an hellgrauen Positionen waren variabel (die entsprechenden Basen sind unter Verwendung des Ambiguity-Code¹⁰⁹ zusammengefasst), an dunkelgrauen Positionen höchstvariabel. Unabhängig von der Natur der Basen bildeten sich für alle RNAs die angegebenen Basenpaarungen aus. Die angegebenen Nukleotide waren ausnahmslos in allen Sequenzen an exakt dieser Position vorhanden.

Das Konsensusmotiv wurde in über 60% der Klone gefunden und faltete sich immer in eine Stammschleifenstruktur mit ausgebulgtem G. Während der untere Teil des Stammes hochvariabel ist, nimmt die Variabilität zur Schleife hin etwas ab. Das G-U-Wobble-Basenpaar war in jeder Sequenz enthalten.

Im Folgenden wurde ein Set aus Sequenzen ausgewählt, um diese näher auf ihre Bindungseigenschaften hin zu untersuchen. Hierfür wurden die im Klonierungs- und Sequenzierungsvektor enthaltenen Sequenzen mittels der Oligonukleotide A50.47_fwd und A50.21_rev amplifiziert und als Matrize für eine *in vitro*-Transkription mit radioaktivem α -³²P-UTP eingesetzt. Die so markierten RNAs wurden mit bioCFX-beads inkubiert (experimenteller Aufbau wie in Kapitel 3.1.5) und ihre Bindung analysiert. Alle getesteten RNAs zeigten eine Bindung an CFX-beads. Die getesteten RNA-Moleküle mit dem Konsensusmotiv (Klone 1, 2, 3, 5, 6, 8, 11 & 23) zeigten annähernd identische Bindung an die Beads (ca. 60% Bindung), mit Ausnahme von CFX_K1 (44% Bindung) und CFX_K2 (77% Bindung). Die RNAs ohne Konsensusmotiv (Klone 10, 14, 16, 18) zeigten ein ähnliches Bindungsverhalten (ca. 60% Bindung).

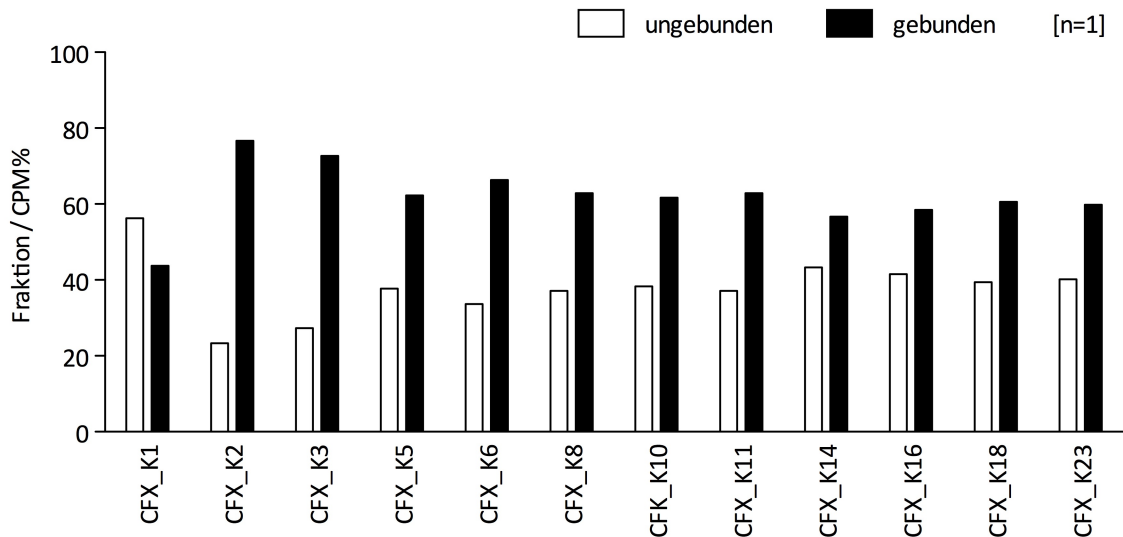


Abbildung 3.10 Bindungsnachweis der Einzelklone.

Die radioaktiv-markierten Einzelklone wurden mit bioCFX-beads inkubiert und nach zweimaligem Waschen eluiert. Die Fraktionen wurden wie oben beschrieben zusammengefasst (ungebunden/gebunden). Dargestellt sind Werte aus Einzelmessungen.

3.1.7 Bestimmung der Bindekonstanten

Die Bindeeigenschaften der getesteten Einzelklone wurden als ausreichend gut eingestuft, um mit einer Auswahl an Sequenzen weitere Charakterisierungen durchzuführen. Hierzu wurden die Bindekonstante (K_D) mittels Filterretention von den Klonen CFX_K1, CFX_K2 und CFX_K18 bestimmt. Klon 1 und 2 besitzen das Konsensusmotiv, wobei bei Klon 1 die konstanten Bereiche in die Faltung involviert sind und bei Klon 2 das Motiv in der Mitte des randomisierten Bereichs präsentiert wird. Klon 1 zeigte von allen überprüften Sequenzen im ersten Bindungsnachweis die schlechteste, Klon 2 die beste Bindung. Klon 18 (ohne das Konsensusmotiv) zeigte ähnlich gute Bindeeigenschaften.

Für die Filterretention wurden die RNAs in das Plasmid pSP64 kloniert. Hierfür wurden die Sequenzen der einzelnen RNAs mit den Oligonukleotiden pSP64_fwd und pSP64_rev vom Sequenzierplasmid pJet amplifiziert. Das Vorwärtsoligonukleotid enthielt neben dem konstanten Bereich des Aptamers auch den T7 Promotor. Die Amplifikate wurden über NheI und EcoRI in pSP64 überführt. Die entsprechenden Plasmide wurden aufgereinigt, mit EcoRI linearisiert und nach Phenolisierung (Kapitel 5.2.3.8) *in vitro* transkribiert (*Run off*-Transkription, Tabelle 5.7). Die Transkription wurde aus einem denaturierenden PAA-Gel aufgereinigt und im Anschluss mit γ - 32 P-ATP radioaktiv endmarkiert. Die RNA-Moleküle (12500 CPM/Ansatz) wurden mit steigender Menge bioCFX-Streptavidin (0 – 8000 nM) in Bindungspuffer inkubiert. Das bioCFX-Streptavidin-Konjugat wurde durch Vorinkubation von bioCFX mit Streptavidin in Bindungspuffer hergestellt (molares Verhältnis bioCFX zu Streptavidin von 2:1). Nach 30-minütiger Inkubation des Reaktionsansatzes bei 37°C wurde dieser über eine Nitrocellulose-Membran filtriert. Die bioCFX-Streptavidin-Konjugate und die daran gebundene RNA binden über ionische und polare Wechselwirkungen an die Nitrocellulose-Membran und werden zurückgehalten, freie RNA nicht. Die Menge an zurückbleibender Radioaktivität wurde dabei zur Gesamtmenge eingesetzter Radioaktivität ins Verhältnis gesetzt und daraus die Bindekonstante berechnet. Die Filterretention und die grafische Darstellung der zurückgehaltenen Radioaktivität sind in Abbildung 3.11 dargestellt.

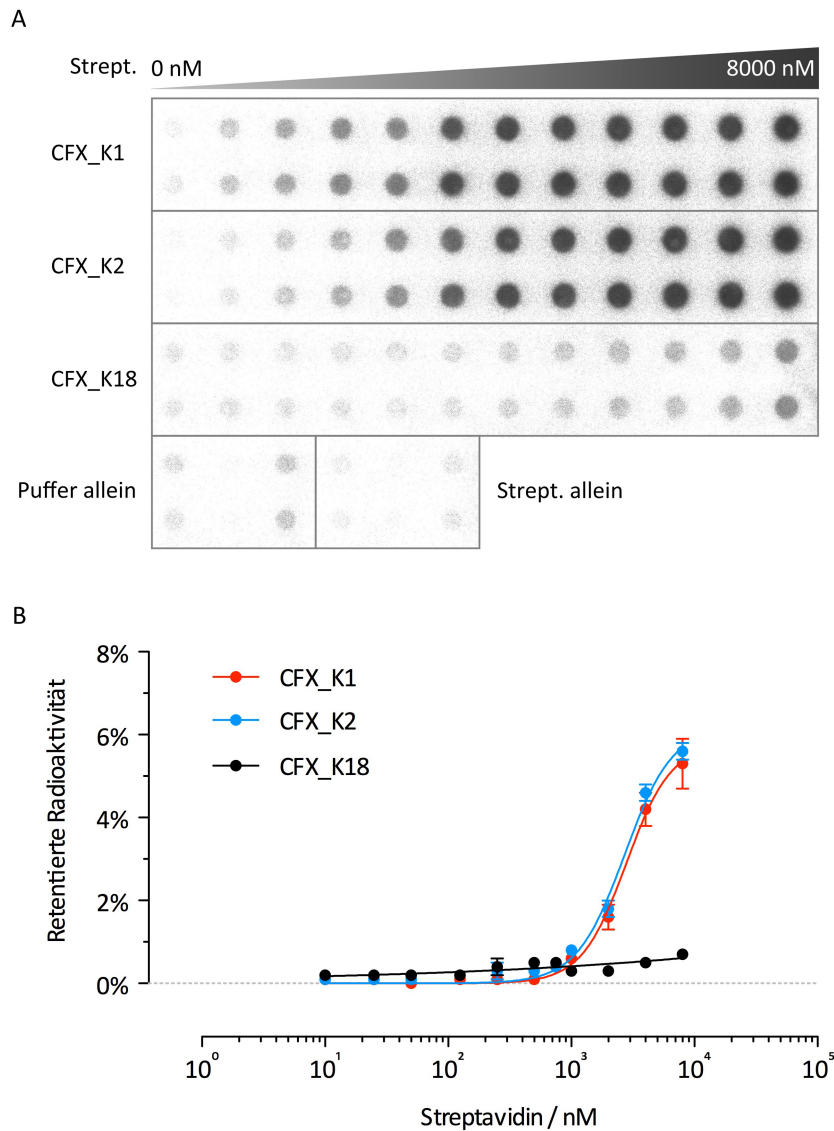


Abbildung 3.11 Filterretention und Bestimmung der Bindekonstanten.

A. Die radioaktiv transkribierten RNAs der Klone 1, 2 und 18 wurden mit steigenden Mengen CFX-Streptavidin-Konjugat bzw. mit Puffer bzw. Streptavidin allein inkubiert. **B.** Aus der Zunahme an zurückgehaltener Radioaktivität konnte für Klon 1 und 2 eine Bindekonstante von ca. 3 μ M abgeschätzt werden. Für Klon 18 konnte keine Bindung detektiert werden. Die abgebildete Filterretention ist exemplarisch. Die in B dargestellten Daten sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Für Klon 18 konnte keine Bindung festgestellt werden. Für die Klone 1 und 2 wurden Bindekonstanten im Bereich von 3 μ M abgeschätzt, da die aufgenommenen Messpunkt auf Grund des experimentellen Aufbaus nicht die Sättigung erreichten. Aus diesem Grund wurden die Klone 1 und 2 nochmals durch isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) vermessen.

Der Vorteil der Bestimmung von Bindekonstanten durch ITC liegt darin, dass es sowohl eine Label-freie Methode ist (eine radioaktive Markierung war somit nicht mehr erforderlich) als auch die Notwendigkeit einer Immobilisierung des Liganden entfällt. Das bedeutet, dass eine Bindung, die durch die Matrix (Streptavidin) unterstützt würde, in der ITC nicht mehr detektierbar wäre. Zusätzlich zur Bestimmung der Bindekonstanten kann man durch ITC weitere zusätzliche thermodynamische Parameter bestimmen.

Für die ITC wurde RNA mit freiem CFX in Bindepuffer inkubiert. Hierfür wurden 10 μ M RNA in Bindepuffer in die Probenzelle vorgelegt und 250 μ M CFX in Bindepuffer in die Spritze des isothermen Titrationskalorimeters (VP-ITC

microcalorimeter, MicroCal) geladen. Nach einer initialen Äquilibration von 3 min bei 37°C wurden 16 Injektionen á 2,5 µl mit Abständen von 3 min injiziert. Zusätzlich zu den Klonen 1 und 2 wurde noch eine unspezifische RNA vermessen sowie Ligand in Puffer alleine (Hintergrund). Die Rohdaten wurden aufgenommen mit erbrachter Leistung (µcal/sec) über die Zeit (min). Die freigesetzte Hitze, die mit den entsprechenden Ausschlägen jedes Titrationsschrittes korrespondiert, wurde integriert und gegen das entsprechende Verhältnis von CFX zu RNA aufgetragen. Die resultierende Kurve wurde durch die „Ligand in Puffer“-Titration korrigiert (Abzug des Hintergrundes). Die Dissoziationskonstante (K_D) wurde auf Grundlage der Kurve, welche mit dem *one-site binding model* der mitgelieferten Software Origin von MicroCal erstellt wurde, berechnet. Die Ergebnisse der ITC sind in Abbildung 3.12 zu sehen.

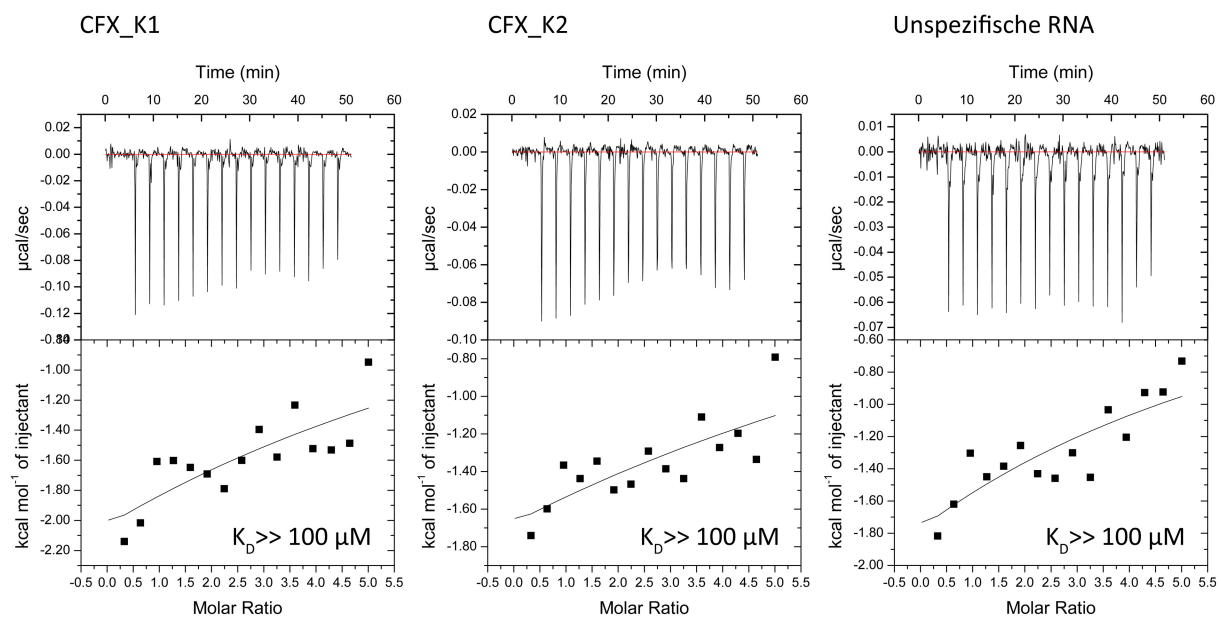


Abbildung 3.12 Isotherme Titrationskalorimetrie der Klone CFX_K1 und CFX_K2.

Oberes Panel: Dargestellt ist die benötigte Energie (µcal/sec) um die Probenzelle auf 37°C zu halten über die Zeit (min) für jeden Titrationsschritt. Die Basislinie wurde automatisch korrigiert (rot). **Unteres Panel:** Integrierte Fläche, der durch die einzelnen Titrationsschritte verursachte Temperaturänderung gegen das molare Verhältnis von CFX zu RNA. Die Punkte wurden gefittet mit einem einseitigen Bindemodell.

In der ITC zeigte sich, dass weder für Klon 1 noch für Klon 2 eine Bindekonstante bestimmt werden konnte, die auch nur annähernd im Bereich des durch Filterretention bestimmten Wertes lag. Die berechneten K_D -Werte für Klon 1 (ca. 800 µM) und Klon 2 (ca. 2,6 mM) lagen in der gleichen Größenordnung wie von der unspezifischen RNA (ca. 550 µM). Da die Reaktionen weder in die Sättigung kamen noch die Änderung der Wärme pro Zeit mit anderen Experimenten vergleichbar war (Vgl. ITC der Mutante des Neomycin-Aptamers U14C¹¹⁰), musste der K_D -Wert mit $\gg 100 \mu\text{M}$ angegeben werden.

Die durch ITC gewonnen Daten sollten durch Fluoreszenztitration verifiziert werden. Hierbei wurden die RNAs CFX_K1 und CFX_K2 sowie die unspezifische RNA eingesetzt. In die Probenkammer des Fluoreszenzspektrometers wurden 50 nM CFX in 2 ml Bindepuffer vorgelegt und die RNA (in Bindepuffer) in den angegebenen Mengen zutitriert (Titriert wurde von 0,25- bis 128-fachen Überschuss an RNA). Die maximale Volumenänderung war <5%. Nach jedem Titrationsschritt wurde die Probenzelle für 30 sec gerührt und im Anschluss 1 min äquilibriert. Die Messungen wurden wie die Selektion bei 37°C durchgeführt. Die Daten am Fluoreszenzspektrometer wurden mit folgenden Einstellungen erhoben: Anregung bei 330 nm mit einer Spaltöffnung von 3 nm, Emission gemessen bei 420 nm mit einer Spaltöffnung von 3 nm, die Integrationszeit

betrug 0,1 sec. Die jeweiligen Datenpunkte (Fluoreszenzwerte in CPS) ohne zutitrierte RNA wurden auf 100% gesetzt. Die Fluoreszenztitrationsen für CFX_K1, CFX_K2 und der unspezifischen RNA sind in Abbildung 3.13 zu sehen.

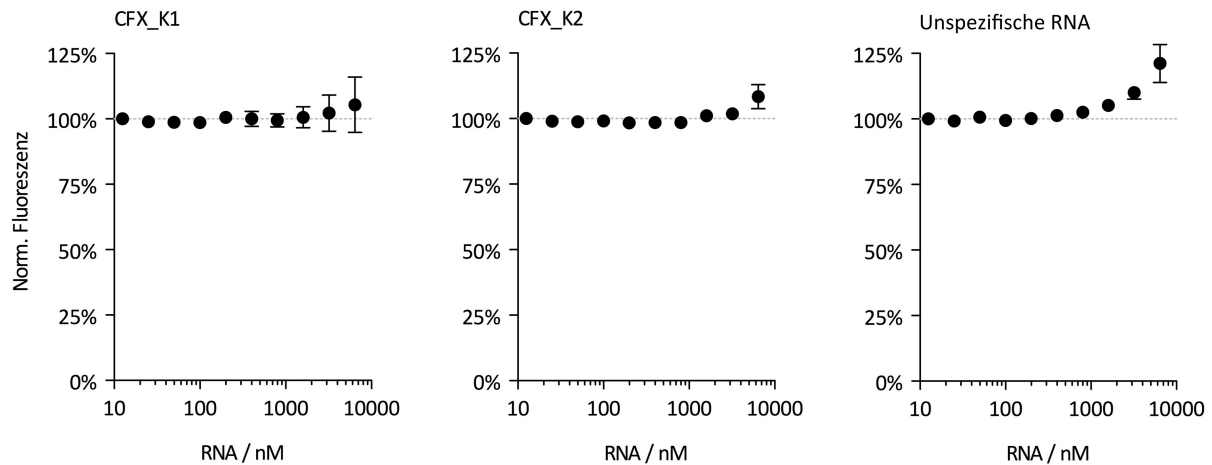


Abbildung 3.13 Fluoreszenztitration der Klone CFX_K1 und CFX_K2.

Dargestellt sind die Fluoreszenztitrationsen der RNAs von CFX_K1, CFX_K2 und einer unspezifischen RNA. Die erhaltenen Fluoreszenzwerte von CFX wurden jeweils auf den Fluoreszenzwert ohne zutitrierte RNA normiert. Die Daten wurden am Fluoreszenzspektrometer Fluorolog-3 (Horiba) mit folgenden Einstellungen gewonnen: Anregung bei 330 nm mit einer Spaltöffnung von 3 nm, Emission gemessen bei 420 nm mit einer Spaltöffnung von 3 nm, die Integrationszeit betrug 0,1 sec. Die horizontale, gepunktete Linie markiert den 100%-Wert. Die dargestellten Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung ergaben sich aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Titration von RNA zu 50 nM CFX zeigte sowohl bei den Klonen CFX_K1, K2 als auch bei der unspezifischen RNA einen leichten Anstieg der Fluoreszenz bei Werten ab 3,2 μ M RNA. Der Anstieg betrug bei 6,4 μ M zwischen 5 und 10 % bei CFX_K1 bzw. CFX_K2 und bei der unspezifischen RNA 21%. Eine signifikante Änderung der Fluoreszenzintensität zum Wert ohne RNA alleine (100%) bzw. zur unspezifischen RNA konnte auch nicht unter Verwendung eines 128-fachen Überschuss von RNA zu CFX festgestellt werden.

3.2 Kontrolle der Intronretention durch das TetR-Aptamer

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte mit Hilfe des TetR-bindenden Aptamers, kurz TetR-Aptamer, ein Riboregulator konstruiert werden, der den Prozess der Intronretention kontrolliert und moduliert. Angefangen auf Reportergenebene sollte die Expressionsplattform systematisch analysiert und Regeln für die Anwendbarkeit definiert werden. Mit Hilfe dieser Regeln sollte der Riboregulator eingesetzt werden, um über Intronretention Apoptose zu steuern.

3.2.1 Das Testsystem

Das TetR-Aptamer sollte eingesetzt werden, um die Entscheidung zu treffen, ob ein Intron gespleißt wird oder nicht. Das System sollte so aufgebaut werden, dass das Aptamer die Zugänglichkeit der 5'SS eines Introns innerhalb eines Reportergens kontrolliert.

Das verwendete, chimäre Intron bestand aus dem 5'-Spleißdonor des ersten Introns des humanen β -Globin-Gens und dem Verzweigungspunkt sowie dem 3'-Spleißakzeptor des Introns, welches zwischen dem *leader* und dem *body* der schweren Kette des Immunglobulin-Gens liegt¹¹¹. Die Sequenzen des Spleißdonors und -akzeptors entsprachen der Konsensussequenz für das Spleißen in humanen Zellen¹¹². Das chimäre Intron enthält in jedem Leserahmen mehrere Stopp-Codons, sodass das retentierte Intron, falls die ungespleißte prä-mRNA nicht im Zellkern zurückgehalten wird, durch diese zu einem verkürzten Reportergen führt und zu niedrigeren messbaren Reportergen-Aktivitäten. Neben der guten Charakterisierung und der breiten Anwendung dieses Introns macht auch die Größe von 133 bp das System geeignet. Das chimäre Intron wurde aus dem Plasmid psiCHECK™-2 entnommen¹¹³.

Das verwendete Reportergen war die Firefly-Luziferase *luc2*, die durch einen bidirektionalen CMV-Promotor konstitutiv exprimiert wurde. Durch den bidirektionalen CMV-Promotor wurde neben der *luc2* auch die *Renilla*-Luziferase (*hRluc*) exprimiert, die zur Normalisierung der Aktivität der Firefly-Luziferase eingesetzt wurde. Die Halbwertszeit der Firefly-Luziferase wurde durch Anfügen einer Destabilisierungssequenz an den C-Terminus reduziert, um Änderungen auf RNA-Ebene schneller auf Proteinebene detektieren zu können. Die Destabilisierungssequenz, auch PEST-Sequenz genannt, stammte aus der C-terminalen Region der murinen Ornithin-Decarboxylase (hPEST¹¹⁴). Das Plasmid wurde pDLP genannt¹¹⁵ (Plasmidkarte und vollständige Beschreibung sind im Kapitel 5.1.1.2 zu finden).

Das chimären Intron (CI) wurde analog zu früheren Arbeiten in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 30 bp nach dem Start-Codon des *luc2*-Gens inseriert⁶⁴. Die Insertion teilt die Firefly-Luziferase in zwei Exons auf (Exon1 und Exon2). Dieses Konstrukt wurde pDLP_CI genannt. Eine Schemazeichnung des bidirektionalen Promotors, beider Luziferasen mit dem CI sowie die Sequenz des CI mit umliegenden Bereichen sind in Abbildung 3.14 zu sehen.

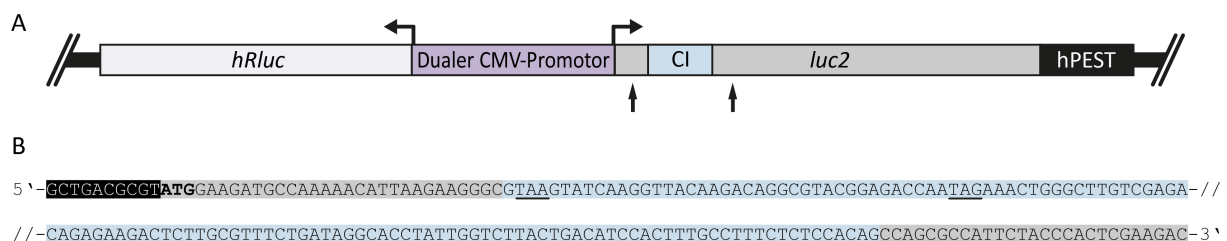


Abbildung 3.14 Schema- und Detailzeichnung des Testsystems.

A. Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus pDLP_CI mit *Renilla*-Luziferase (*hRluc*), dualem CMV-Promotor, Firefly-Luziferase (*luc2*), chimären Introns (CI) und Destabilisierungssequenz (*hPEST*). Schwarze, senkrechte Pfeile: Bindestellen der Oligonukleotide

Luc2_fwd6 und Luc2_rev2, welche für die RT-PCR-Analyse der Spleißvarianten eingesetzt werden sollte. **B.** Sequenzausschnitt um das chimäre Intron (blau hinterlegt) und den umliegenden exonischen Bereichen des *luc2*-Gens (grau) sowie ein Teil des nicht-translatierten Bereichs (schwarz). Das Start-Codon ATG ist dick gedruckt, die ersten Stopp-Codons in jedem Leserahmen sind jeweils unterstrichen.

Das Spleißen des chimären Introns sollte durch Verwendung des TetR-Aptamers kontrolliert werden. Die dahinterstehende Idee war, den Zugang des Spleißosoms zur 5'SS zu blockieren. Aus früheren Experimenten war bekannt, dass die Insertion des Aptamers 6 nt nach der 5'SS am erfolgversprechendsten war¹¹⁶. Der vorgeschlagene Wirkmechanismus ist der Abbildung 3.15 zu entnehmen.

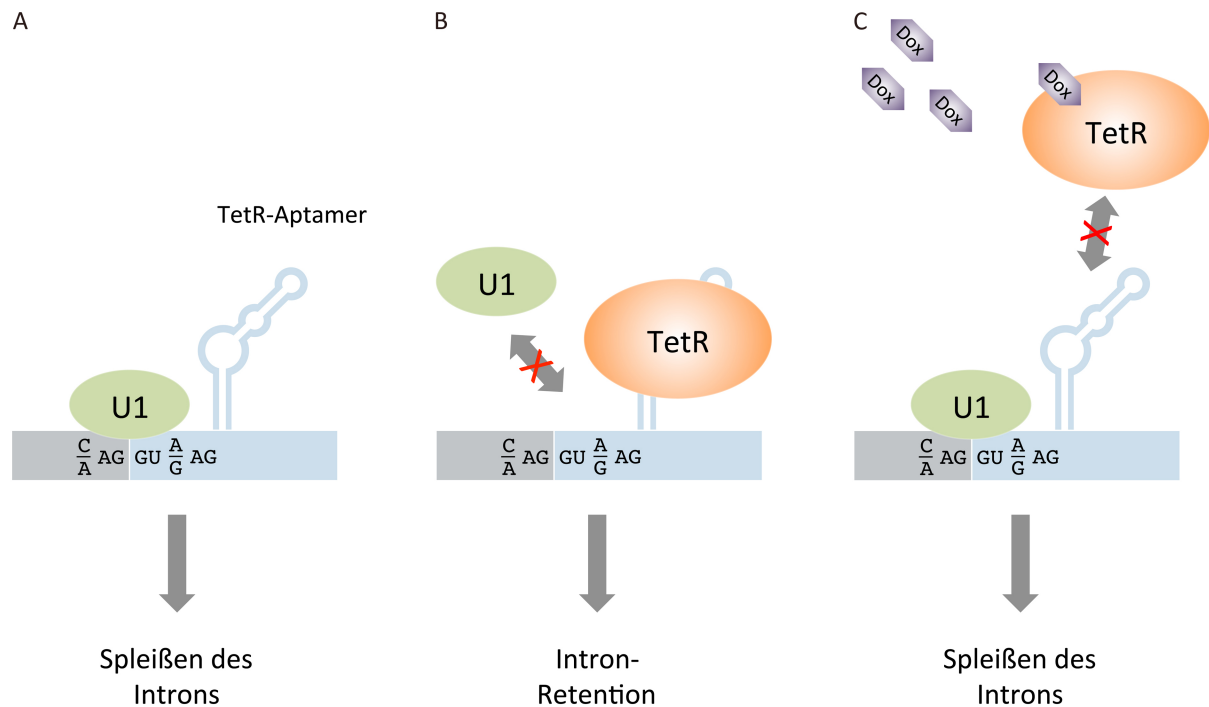


Abbildung 3.15 Vorgeschlagener Wirkmechanismus.

In dieser allgemeinen Vorstellung der Idee des Testsystems ist die 5'SS mit der für humane Zellen bekannten Konsensussequenz angegeben. Das Exon ist in grau und das Intron in hellblau hinterlegt. Das TetR-Aptamer mit seiner Stammschleifenstruktur ist schematisch in hellblau gezeichnet. Das U1-snRNP, das Bestandteil des Spleißosoms ist, ist als grünes Oval abgebildet, der Ligand des TetR-Aptamers, der Tet-Repressor TetR in orange. Doxycyclin, als Induktor für TetR, ist als violettes Hexagon eingezeichnet. **A.** In Abwesenheit des Liganden TetR ist die 5'SS frei zugänglich und das U1-snRNP kann binden. Das Spleißosom sollte in der Lage sein das Intron herauszuspleißen. Dadurch wird der Leserahmen des Reportergens wiederhergestellt. **B.** Durch Überexpression von TetR und Bindung an das Aptamer wird die 5'SS sterisch blockiert. Dies führt dazu, dass die 5'SS nicht erkannt und das Intron retentiert wird. Durch die im Intron enthaltenen Stopp-Codons kommt es zu einer verfrühten Termination der Translation und eine damit verbundene erniedrigte Reporterogenaktivität. **C.** Durch Zugabe von Dox ändert TetR seine Konformation und die Affinität an das TetR-Aptamer wird stark reduziert. Daraufhin wird die 5'SS wieder freigegeben und das Intron kann erkannt und herausgespleißt werden. Somit entspricht der letztgenannte Zustand C dem Zustand A, wenn man auf die Ebene des Reportergens betrachtet.

Wenn der Ligand des TetR-Aptamers, der Tet-Repressor, nicht vorhanden ist, kann das Spleißosom die 5'SS durch das U1-snRNP erkennen und das Intron sollte herausgespleißt werden (Abbildung 3.15 A). Wird der Ligand in der Zelle exprimiert, bindet TetR an das Aptamer und die 5'SS ist nicht mehr zugänglich (Abbildung 3.15 B). Infolgedessen wird das Intron retentiert, was zu einer messbaren Reduktion der Reporterogenaktivität führen sollte. Wird zusätzlich Doxycyclin ins System eingebracht, sollte dessen Bindung an den Tet-Repressor eine Konformationsänderung hervorrufen, sodass TetR

nicht mehr an das TetR-Aptamer binden kann (Abbildung 3.15 C). Dadurch wird die 5'SS wieder zugänglich und das Intron sollte herausgespleißt werden können.

Dieses aus drei Teilen bestehende System (TetR-Aptamer im CI, TetR und Dox) macht es möglich drei Zustände zu definieren. Hierbei sollte der Zustand 1 (Abbildung 3.15 A) dem Zustand 3 (Abbildung 3.15 C) entsprechen, wenn auf Ebene des Reportergens geschaut wird. Da die Induktionseffizienz von Dox systemabhängig ist, muss dies im Folgenden bewiesen werden, damit die Aussage bestätigt werden kann, dass zur vollständigen Beschreibung des Systems Zustand 2 und 3 ausreichend sind (siehe hierzu Kapitel 3.2.4).

In den nächsten Kapiteln soll zuerst die allgemeine Methodik der Experimente beschrieben werden, gefolgt von der Optimierung des Liganden TetR und der systematischen Charakterisierung des auf TetR-basierenden Riboregulators.

3.2.2 Allgemeine Methodik

In diesem Kapitel soll die allgemeine Methodik beschrieben werden, mit der alle folgenden Experimente im Reporter-System durchgeführt wurden. Mit Hilfe des Reporter-Systems konnten die konstruierten Plasmide einfach und schnell vermessen werden. Dennoch war es notwendig, neben Reporter-Assays auch Analysen durchzuführen, die die RNA-Ebene abbilden. Hierfür wurde total RNA aus den Zellen extrahiert und nach Umschreiben in cDNA durch qRT-PCR- bzw. RT-PCR-Analysen untersucht.

Wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben wird, ist es ausreichend Zustand 2 und 3 zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden alle Zellen immer mit dem entsprechenden Reporter-Konstrukt und dem TetR-Expressionsplasmid transfiziert. Geschaltet wurde das System durch Zugabe von 50 µM Dox. Die Transfektionsreaktionen wurden im Allgemeinen mit dem Leervektor pWHE-cmv auf die vom Hersteller des Transfektionsreagens empfohlene Gesamtmenge an zu transfizierender DNA aufgefüllt. Das Plasmid pWHE-cmv wurde vom TetR-Expressionsplasmid durch Deletion des Promotors abgeleitet. Das Transfektionsschema sowie die Menge an transfizierter DNA und die Menge an Zellen für die jeweiligen Experimente sind detailliert im Kapitel 5.2.2 aufgelistet. In den folgenden Absätzen wird kurz dargelegt, wie die Luciferase-Assays bzw. die RNA-Extraktionen und (q)RT-PCR-Analysen durchgeführt wurden.

Für die Luciferase-Assays wurden 50 ng Reporterplasmid mit 100 ng TetR-Expressionsplasmid zusammen mit 850 ng Leervektor pWHE-cmv transfiziert. Hierfür wurden am Vortag Hek-293-Zellen in 24-*well*-Platten zu je 125.000 Zellen/*well* ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion betrug die Konfluenz ca. 80%. Die zweistündige Transfektion wurde in Opti-MEM durchgeführt und im Anschluss wurde das Medium gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt wurden die entsprechenden Reaktionen mit 50 µM Dox supplementiert und für weitere 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Luciferase-Assay wurde mit dem Dual-Glo® Luciferase Assay System von Promega streng nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Aktivität der Firefly-Luciferase wurde auf die Aktivität der *Renilla*-Luciferase normiert. Um die verschiedenen Konstrukte miteinander vergleichen zu können und um natürliche Schwankungen von Experiment zu Experiment ausgleichen zu können, wurde immer das entsprechende Reporter-Konstrukt ohne TetR-Aptamer in einer parallelen Reaktion mitgeführt. Auf die so erhaltenen, normierten Luciferase-Aktivitäten wurden alle anderen gemessenen Werte bezogen.

Zur Durchführung von (q)RT-PCR-Analysen wurden 250.000 Hek-293-Zellen in 12-*well*-Platten ausgesät und am Folgetag mit den doppelten Mengen Reporterplasmid, TetR-Expressionsplasmid und Leervektor wie im Luciferase-Assay transfiziert. Nach zwei Stunden Transfektion wurde das Medium gewechselt und die entsprechenden Konstrukte

erhielten 50 μ M Dox. Bei den Transfektionen für (q)RT-PCR-Analysen wurden auch Reaktionen inkludiert, welche nur TetR-Expressionsplasmid und Leervektor enthielten (Mock). Nach Inkubation von 24 h wurde die RNA präpariert, in cDNA umgeschrieben und durch (q)RT-PCR-Analysen untersucht. Die präparierte total RNA wurde mittels *Random Hexameren* (N_6) in cDNA umgeschrieben. Dies brachte den Vorteil, dass einmal hergestellte cDNA sowohl zur Analyse der verschiedenen Spleiß-Varianten und der Normalisatoren (Haushaltsgene) verwendet werden konnte. In den RT-PCR-Analysen wurden die Oligonukleotide so gewählt, dass sie außerhalb des Introns hybridisieren konnten und somit in der Lage waren gespleißte wie ungespleißte RNA-Spezies zu detektieren, die Oligonukleotide für qRT-PCR-Analysen wurden so designt, dass entweder nur die gespleißte bzw. nur die ungespleißte Form der mRNA detektiert wurde (Bindung des Vorwärts-Oligonukleotid entweder über Exon-Exon-Grenze bzw. Exon-Intron-Grenze; Rückwärts-Oligonukleotid war in beiden Fällen immer identisch). In den (q)RT-PCR-Analysen wurde immer eine Kontrollreaktion ohne Matrize durchgeführt, um Verunreinigungen der cDNA oder Chemikalien mit pDNA zu detektieren (sogenannte Wasser-Kontrolle). Bei den qRT-PCR-Analysen wurde zusätzlich, nach der Quantifizierung der entsprechenden Spleiß-Varianten, immer eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Amplifikate zu bestätigen. Die qRT-PCR-Daten wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet¹¹⁷.

Alle gemachten Angaben sind für alle folgenden Experimente gültig, falls nicht anders angegeben.

3.2.3 Optimierung des Liganden TetR

Der Ligand des TetR-Aptamers ist das bakterielle Repressorprotein TetR, welches als Homodimer in der Zelle vorliegt⁸³. Da Spleißen im Zellkern stattfindet, das TetR-Homodimer mit 46,6 kDa¹¹⁸ allerdings zu groß für eine freie Diffusion durch die Kernpore ist¹¹⁹, wurde zu Beginn der Arbeit das TetR-Protein durch Anfügen einer Kernlokalisationssequenz (*nuclear localisation sequence*, NLS) optimiert. Kernlokalisationssequenzen sind kurze Peptide, die den Kernimport durch Bindung an bestimmte Rezeptoren in der Zelle ermöglichen. Die Rezeptoren, bekannt als Importine (α und β 1), binden die NLS und transportieren mit Hilfe von Ran-GTP unter GTP-Verbrauch die Fracht in den Zellkern. Die Importine erkennen bestimmte Klassen von (klassischen) NLS. Diese können in einteilige bzw. zweiteilige NLS unterteilt werden, je nachdem ob die Erkennungssequenz unterbrochen ist oder nicht. Die hier verwendete NLS „PAAKRVKLD“ stammt von dem Proto-Oncogen *c-myc* und gehört zu den klassischen, einteiligen Kernlokalisationssequenzen¹²⁰. Diese sind häufiger am N-Terminus von Proteinen zu finden, als am C-Terminus. Da aber beides möglich ist, sollte auch bei TetR beide Varianten getestet werden. Um die Faltung von TetR sowie dessen Dimerisierung nicht zu stören, wurde zwischen der NLS und TetR ein Glycin-Serin-Linker (SGGGGS) eingesetzt. Das Plasmid mit der unveränderten TetR-Variante war pCMV_TetR. TetR steht hier unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors, gefolgt von einer SV40-Polyadenylierungssequenz (Weitere Details zum Plasmidrückgrat sind in Kapitel 5.1.1.1 zu finden). Die Varianten mit N-terminaler NLS bzw. C-terminaler NLS wurden analog dazu pCMV_NLS_TetR bzw. pCMV_TetR_NLS genannt (Klonierungsdetails sind in Kapitel 5.1.2.1 und 5.1.2.2 zu finden).

Zum Nachweis der Funktionalität der NLS wurden Hek-293-Zellen mit den verschiedenen Varianten des TetR-Proteins in 6-well-Platten transfiziert (Kapitel 5.2.2.2) und Protein-Kernextrakt wurde hergestellt (Kapitel 5.2.9). Die Menge an TetR im Zellkern wurde mittels Westernblot nachgewiesen (Kapitel 5.2.11). Als Ladekontrolle diente β -Actin und als Negativkontrolle Mock-transfizierte Zellen (nur pWHE-cmv). Der Antikörper anti-TetR wurde 1:5000 verdünnt, der anti-Actin Antikörper 1:7000. Der Nachweis beider Antikörper erfolgte über HRP-konjugierte Zweitantikörper unter

Verwendung einer chemilumineszenz-Reaktion (Kapitel 5.2.11). Der Westernblot und dessen Quantifizierung sind in Abbildung 3.16 zu sehen.

Ohne NLS kann nur ein schwaches Signal auf Höhe von etwa 24 kDa erkannt werden, was dem berechneten Molekulargewicht (M_w) von 23,8 kDa entspricht. Das Anfügen der NLS am C-Terminus (berechnetes $M_w = 24,8$ kDa) erhöhte die Menge an TetR auf das 2,5-fache, während es bei der TetR-Variante mit N-terminaler NLS bis zu einer 40-fachen Anreicherung von TetR im Zellkern kam. Ein funktionaler Test der TetR-Varianten mit Reporter gen wurde durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle 6.3 zu finden.

Für die weiteren Experimente wurde die TetR-Variante mit N-terminaler NLS (pCMV_NLS_TetR) verwendet.

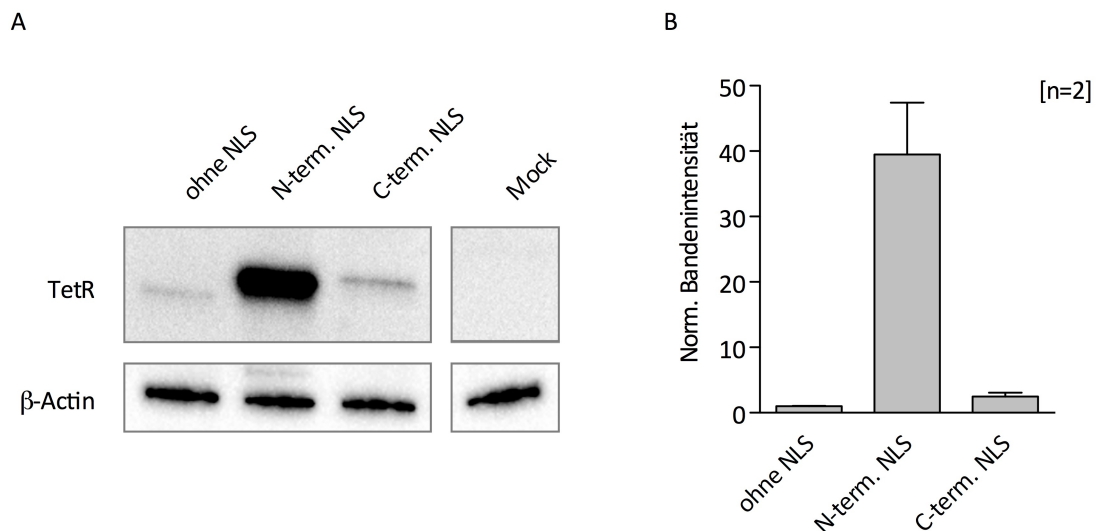


Abbildung 3.16 Nachweis der TetR-Varianten im Proteinkernextrakt mittels Westernblot.

Hek-293-Zellen wurden mit der TetR-Variante ohne NLS (pCMV_TetR), mit N-terminaler NLS (pCMV_NLS_TetR) und mit C-terminaler NLS (pCMV_TetR_NLS) transfiziert. Als Kontrolle dienten Mock-transfizierte Zellen (nur pWHE-cmv). Als Ladekontrolle diente β -Actin. **A:** Westernblot der TetR-Varianten mit Ladekontrolle β -Actin. **B:** Quantifizierung der Pixelintensitäten der Signale aus A mittels ImageLab (BioRad). Das Hintergrundrauschen wurde hier automatisch von den einzelnen Pixelintensitäten subtrahiert. Die Bandenintensitäten der jeweiligen TetR-Varianten wurden auf β -Actin normiert und pCMV_TetR wurde auf 1 gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten. Der vollständige Westernblot ist im Anhang Abbildung 6.2 zu finden.

3.2.4 Äquivalenz von Zustand 1 und Zustand 3

In Kapitel 3.2.1 wurde bereits diskutiert, dass der Zustand ohne Dox und ohne TetR (Zustand 1) identisch mit dem Zustand 3 sein sollte, bei dem beide Komponenten anwesend sind. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde pFG2 (Reporter genkonstrukt, das die Aptamervariante 12_1P 6 nt nach der 5'SS innerhalb des CI trägt. Vorstellung des Konstrukts und genauere Beschreibung folgt in Kapitel 3.2.6) in allen drei Zuständen vermessen. Hierfür wurde pFG2 in Hek-293-Zellen nur mit Leervektor transfiziert (pWHE-cmv), bzw. mit pCMV_NLS_TetR und Leervektor. Letzterer Ansatz wurde zusätzlich noch mit ± 50 μ M Dox behandelt. Als Referenzwert dienten Hek-293-Zellen, die mit pDLP_CI transfiziert und unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

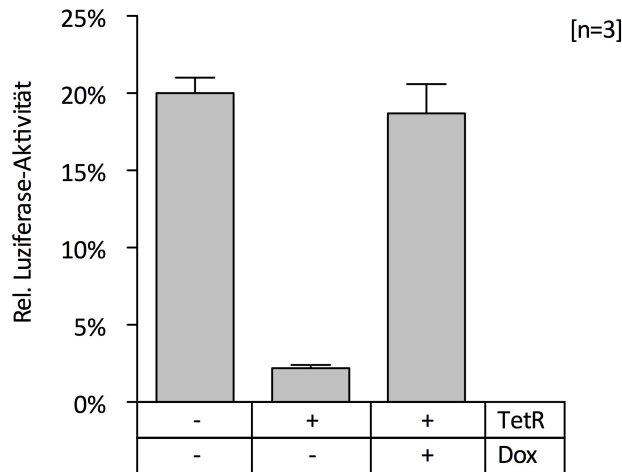


Abbildung 3.17 Zusammenhang der Luziferase-Aktivität in Abhängigkeit des Zustandes des Systems.

Dargestellt sind die relativen Luziferase-Aktivitäten der mit pFG2 transfizierten Hek-293-Zellen und den in der Tabelle angegebenen Faktoren (TetR = pCMV_NLS_TetR, Dox = 50 μ M Dox). Alle Daten wurden auf pDLP_CI in An- und Abwesenheit der angegebenen Faktoren normalisiert. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Transfektion von pFG2 in Abwesenheit von TetR und Dox führt zu einer relativen Luziferase-Aktivität von 20%. Durch Co-Transfektion von pCMV_NLS_TetR wurde die Aktivität auf ca. 2% gesenkt, konnte aber durch Applikation von 50 μ M Dox wieder auf ca. 19% gesteigert werden. Somit ist auf Basis der relativen Luziferase-Aktivitäten kein Unterschied zwischen dem Zustand -TetR/-Dox und +TetR/+Dox zu sehen. Der Riboregulator wird folglich durch Applikation von 50 μ M Dox geschaltet (induziert) werden.

Nachdem nun gezeigt wurde, dass das System durch die Quantifizierung von Zustand 2 und 3 ausreichend beschrieben ist, wurde im Folgenden überprüft, ob die gemessene Aktivität des Reportergens mit der mRNA-Menge korreliert. Des Weiteren wurde der Einfluss von TetR-Expression und Dox-Applikation auf die Basisvektoren untersucht, um unspezifische Effekte ausschließen zu können.

3.2.5 Äquivalenz von Luziferase-Assay und (q)RT-PCR-Analysen

Da Spleißen ein RNA-basierter Prozess ist, bestand die Möglichkeit, dass die gemessenen Luziferase-Aktivitäten nicht direkt mit den Vorgängen auf RNA-Ebene korrelieren. An Konstrukt pFG2 wurde überprüft, dass die Ergebnisse des Luziferase-Assays die Änderungen auf mRNA-Ebene widerspiegeln. Diese wurden über (q)RT-PCR-Analysen quantifiziert. Ähnliche Analysen wurden für weitere Konstrukte durchgeführt, auf die in den entsprechenden Kapiteln verwiesen wird.

Die Luziferase-Assays wurden wie bereits im Kapitel 3.2.2 beschrieben durchgeführt. Für die Untersuchung wurden neben dem Konstrukt pFG2 auch pDLP_CI (Konstrukt ohne Aptamer) und pDLP (Konstrukt ohne Intron) transfiziert. Für die ebenfalls schon beschriebenen (q)RT-PCR-Analysen wurde zusätzlich noch eine Mock-Transfektion durchgeführt. Die RT-PCR-Analysen zur Detektion der Spleiß-Varianten wurden hergestellt unter Verwendung der Oligonukleotide Luc2_fwd6 und Luc2_rev2, während die Induktion durch Dox bei der qRT-PCR mittels der Oligonukleotide Luc2_fwd9 und Luc2_rev2 nachgewiesen wurden. Das Oligonukleotid Luc2_fwd9 bindet dabei die Exon-Exon-Grenze und weist somit die gespleißte Form des *luc2*-Gens nach. Für die β -Actin-PCR wurde sowohl bei der RT- als auch bei der qRT-PCR die Oligonukleotide

Actin_99bp_fwd und Actin_99bp_rev verwendet. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 3.18 zusammengefasst.

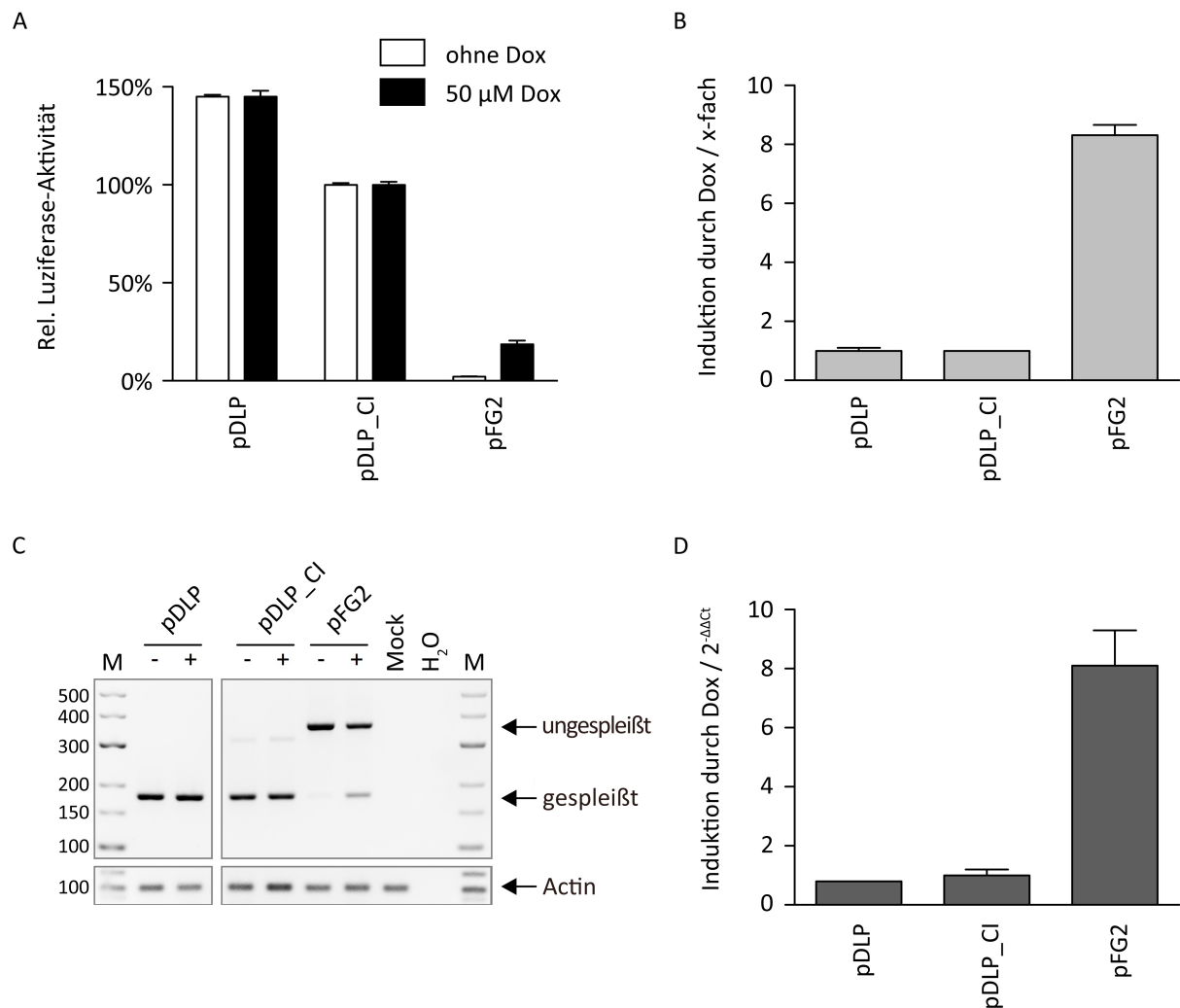


Abbildung 3.18 Äquivalenz zwischen Luciferase-Assay und (q)RT-PCR-Analysen.

A. Luciferase-Assay von in Hek-293-Zellen transfizierten Konstrukten $\pm 50 \mu$ M Dox. Alle erhaltenen Luciferase-Aktivitäten wurden normiert auf pDLP_CI. Weiße bzw. schwarze Balken präsentieren die Werte in Ab- bzw. Anwesenheit von 50μ M Dox. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. **B.** Darstellung der aus den in A abgeleiteten Regulationsfaktoren. **C.** RT-PCR-Analyse der angegebenen Konstrukte in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von 50μ M Dox. Die Höhe der zu erwartenden Signal für die gespleißte bzw. ungespleißte Form des *luc2*-Gens sind mit Pfeilen entsprechend markiert, genauso wie Actin. Die RT-PCR-Analyse, um die Spleißvarianten zu detektieren, wurden mit den Oligonukleotiden Luc2_fwd9 und Luc2_rev2, für die Actin-PCR wurden die Oligonukleotide Actin_99bp_fwd und Actin_99bp_rev verwendet. Die Größen des DNA-Größenstandards sind eingezeichnet. **D.** Quantifizierung der gespleißten Form der *luc2*-mRNA durch qRT-PCR mittels der $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Die Ergebnisse in C und D stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Bei der qRT-PCR wurden zusätzlich technische Replikate verwendet.

Aus den Luciferase-Daten war ersichtlich, dass das Einbringen des chimären Introns die basale Expression ein wenig reduziert (von ca. 140% auf 100%). Das Einbringen des TetR-Aptamers in das chimäre Intron reduzierte die basale Expression auf ca. 20% (Abbildung 3.18, A). Auf die Kontrollen pDLP und pDLP_CI hatte Dox keinen Einfluss. Das Konstrukt pFG2 besaß im Luciferase-Assay einen Schalfaktor von 8,3-fach (Abbildung 3.18, B). Vergleicht man die relativen Luciferase-Aktivitäten mit den Signalstärken im Gel der RT-PCR-Analyse, so korrelierten diese sehr gut. Die

Bandenintensität von pDLP_CI „gespleißt“ ist etwas schwächer als bei pDLP und ein Einfluss von Dox war nicht zu erkennen. Das Konstrukt pFG2 hingegen mit der niedrigeren basalen Expression zeigt in der RT-PCR-Analyse eine höhere Signalintensität des Fragments auf Höhe der ungespleißten Form. Der Einfluss von Dox auf die Signalstärke der gespleißten Form ist deutlich zu erkennen. Die Unterschiede in den Mengen der gespleißten Form der *luc2*-mRNA wurde mittels qRT-PCR unter Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode quantifiziert¹¹⁷. Während pDLP und pDLP_CI keine Dox-abhängige Regulation zeigten, ist der Regulationsfaktor bei pFG2 8,1-fach und somit fast identisch mit den Induktionsfaktoren, die im Luziferase-Assay beobachtet wurden (Vgl. Abbildung 3.18 B und D).

Zusätzlich zu den Luziferase-Daten und den (q)RT-PCR-Analyse wurden die entstandenen PCR-Amplifikate, die in den Spuren von pFG2 (beide Spuren) zu sehen waren, aus dem Gel ausgeschnitten, mittels CloneJet PCR Cloning Kit in das Plasmid pJet1.2 kloniert und sequenziert. Die Sequenzierungen bestätigten, dass korrekt gespleißt wurde. Das obere Fragment bei ca. 380 bp ist die ungespleißte Form der *luc2*-mRNA, während das untere Fragment bei ca. 180 bp die gespleißte Form darstellt.

Nachdem gezeigt wurde, dass zur Beschreibung des Systems die Luziferase-Assays zu Zustand 2 und 3 ausreichend sind und weder TetR noch Dox einen unerwünschten Einfluss auf die Basisvektoren pDLP und pDLP_CI hatten, wurde begonnen den Riboregulator zu optimieren.

3.2.6 Testung verschiedener Aptamervarianten im chimären Intron

Die Stammstabilität des TetR-Aptamers spielt bei der Regulation der Genexpression in *E. coli* eine wichtige Rolle⁹⁰. Bis zu einem ΔG -Wert des Stammes von ca. -23 kcal/mol stieg die regulatorische Aktivität an, weitere Stammstabilisierungen hatten keinen Effekt auf die Aktivität. Für die Spleißregulation des TetR-Aptamers könnte der Abstand zur 5'SS, aber auch die Stabilität des Aptamerstammes eine der wichtigsten Faktoren darstellen. Aptamerstabilität und Abstand zur Expressionsplattform konnten bereits in anderen Studien als wichtige Größen ausgewiesen werden^{29,121}. Um diese Faktoren empirisch zu ermitteln, wurde die Arbeit mit den Aptamervarianten 12_1P, 12_1R und 12_1X aus der Studie von Hunsicker *et al.* begonnen. Die Aptamervarianten wurden innerhalb des Introns, 6 nt nach der 5'SS, platziert. Abbildung 3.19 zeigt eine schematische Darstellung der drei Konstrukte und deren Sequenz. Die gezeigte Sekundärstruktur der Aptamervarianten wurde aus der Originalarbeit übernommen, die exonischen und intronischen Sequenzen sind unstrukturiert dargestellt.

Das Konstrukt pFG1, welches den längsten Stamm besitzt, entspricht der ursprünglichen TetR-Aptamervariante 12_1R. Das Plasmid pFG2 besitzt einen um 3 bp kürzeren Stamm und leitet sich von 12_1P ab. Zur Konstruktion von pFG3 wurde der terminale Loop von pFG2 gegen den stabileren Tetraloop von 12_1X ausgetauscht. Die Stabilisierung des Loops sollte bei der Ausbildung der TetR-Bindetasche unterstützend wirken.

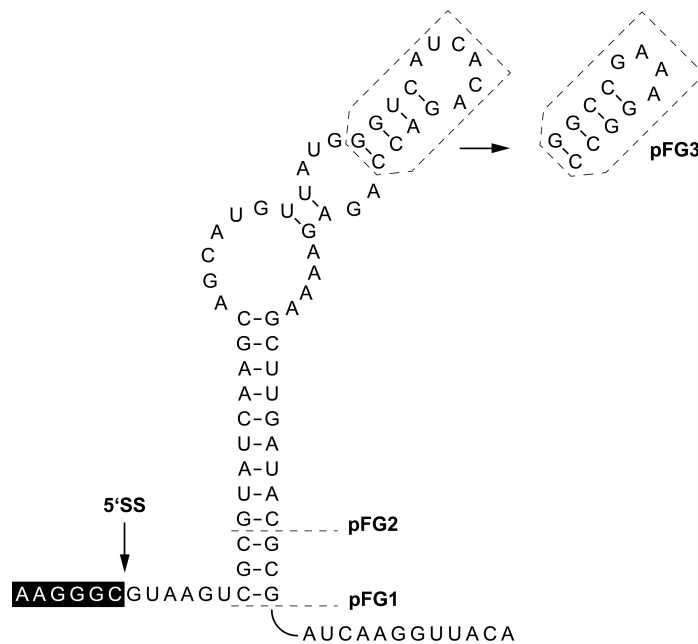


Abbildung 3.19 Schematische Darstellung der Konstrukte pFG1, pFG2 und pFG3.

Die verwendeten Aptamervarianten in pFG1, pFG2 und pFG3 entsprechen den ursprünglich definierten Aptamervarianten 12_1R, 12_1P und 12_1X von Hunsicker *et al.* Die Faltung der Aptamere ergab sich unter Verwendung des Sekundärstrukturvorhersageprogramms mFold¹⁰⁷ und stimmt mit der durch *in-line probing*-Experimenten bestätigten Struktur überein. Abgebildet ist ein Teil des Exon I der Firefly-Luziferase bis zur 5'SS (schwarz hinterlegt) sowie die 5'SS des CI (6 nt), die Aptamervarianten und die darauffolgenden intronischen Sequenzen.

Die Konstrukte pFG1, pFG2 und pFG3 sowie das Referenzplasmid pDLP_CI (ohne Aptamer) wurden in Hek-293-Zellen transfiziert und für Luziferase-Assays verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20 dargestellt.

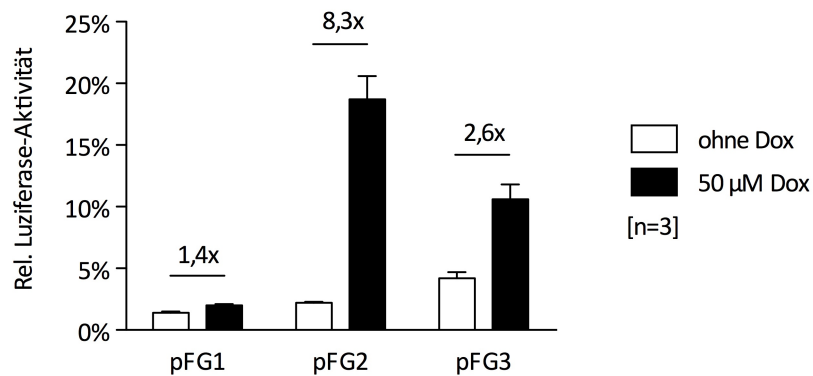


Abbildung 3.20 Luziferase-Assay der initial verwendeten Aptamervarianten.

Dargestellt ist die relative Luziferase-Aktivität von Hek-293-Zellen, welche mit den angegebenen Konstrukten transfiziert wurden. Auf Behandlung der Zellen mit 50 µM Dox steigt die Reportergen-Aktivität an. Die Mittelwerte mit Standardabweichung ergaben sich aus drei unabhängigen Experimenten.

Durch Zugabe von 50 µM Dox konnte bei allen drei Konstrukten die Reportergen-Aktivität gesteigert werden. Während pFG1 1,4- und pFG3 2,6-fach induziert wurden durch Dox-Applikation, zeigte pFG3 mit 8,3-facher Induktion den stärksten Anstieg.

3.2.7 Variation der Intronposition

Mithilfe des Konstruktes pFG2 sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Intronposition sowie dessen Sequenzumgebung einen Einfluss auf die Effizienz des Riboregulators hat. Die Intronposition in Konstrukt pFG2 ist nahe am ATG der *luc2*-mRNA. Des Weiteren entspricht die 5'SS nicht der Konsensussequenz für Spleißen in humanen Zellen und stellt eine mittelstarke Spleißseite dar.

Das Intron wurde, mit und ohne Aptamer, an verschiedenen Positionen innerhalb des Luziferase-Gens platziert. Hierbei wurde das Intron ±Aptamer aus pDLP_CI bzw. pFG2 amplifiziert und über Overlap-PCR an die verschiedenen Positionen gesetzt (Klonierungsdetails zu allen Konstrukten sind im Kapitel 5.1.2.7 zu finden).

Die Positionen der Introninsertion, die entsprechenden Plasmidbezeichnungen, der Abstand zum ATG und die Sequenzumgebung des Introns sind der Tabelle 3.2 zu entnehmen. Die Konstrukte ohne Aptamer wurden konstruiert, um die Aptamer-enthaltenden Konstrukte zu normieren.

Tabelle 3.2 Intronpositionen und die zugehörigen Sequenzumgebungen.

Position	Bezeichnung	Abstand zum ATG [bp] ^a	Sequenz vor CI ^b	Sequenz nach CI ^b
1	pFG2	30	AAGGGC	CCAGCG
2	pFG4	989	CAAACG	CTTCCA
3	pFG5	1344	TACCAG	GTAGCC
4	pFG6	12	GATGCC	AAAAAC
5	pFG7	29	GAAGGG	CCCAGC
6	pFG8	31	AGGGCC	CAGCGC
7	pFG9	34	GCCCAG	CGCCAT
8	pFG10	334	ACGAGC	GCGAGC
9	pFG11	3	CGTATG	GAAGAT
10	pFG12	66	GCCGGC	GAGCAG
11	pFG13	111	CCCGGC	ACCATC
12	pFG14	299	TGTGGC	TGTGGC
13	pFG15	305	TGTGGC	CCCAGC

^a Abstand des CI zum ATG.

^b Die Sequenz vor dem CI, sowohl nach dem CI sind angegeben. Dazwischenliegend ist das CI platziert mit der Sequenz wie es in Abbildung 3.14 (blau hinterlegt) zu finden ist.

Intronposition 1 wurde, wie bereits erwähnt, auf Basis der Erfahrungen der Spleißregulation in *S. cerevisiae* gewählt⁶⁴. Positionen 2 und 3 waren ursprüngliche Intronpositionen innerhalb des Luziferase-Gens, wobei Position 3 mit dem CAG vor der 5'-SS der Konsensussequenz in humanen Zellen entspricht¹²². Bei Position 4 – 7 wurde das Intron in einem ähnlichen Abstand zum ATG, wie in pFG2, innerhalb der Luziferase platziert. Das Intron an Position 9 wurde direkt hinter das Startcodon ATG gesetzt und die Positionen 12 – 15 wurden bezüglich der Sequenzumgebung so gewählt, dass sie der Position 1 möglichst ähnlich waren. In Abbildung 3.21 sind die Induktionen der Luziferase-Aktivitäten durch 50 µM Dox der entsprechenden Plasmide dargestellt.

Im Vergleich zu pFG2 konnten nur zwei weitere Intronpositionen mit ähnlich guten Schalteigenschaften gefunden werden: pFG4 mit 10,2-facher und pFG8 mit 14,7-facher Regulation. Die Konstrukte pFG6, pFG12 und pFG15 zeigten eine mittlere Induktion von ca. 2,3-fach. Alle anderen Konstrukte lagen unter 2-facher Regulation. Interessanterweise waren die Konstrukte pFG12 – pFG15, obwohl sie im Hinblick auf die 5'SS die größte Sequenzähnlichkeit zu pFG2 besaßen, nicht sonderlich aktiv. Ein direkter, gradueller Zusammenhang zwischen Abstand zum Startcodon und Sequenzumgebung war nicht ersichtlich.

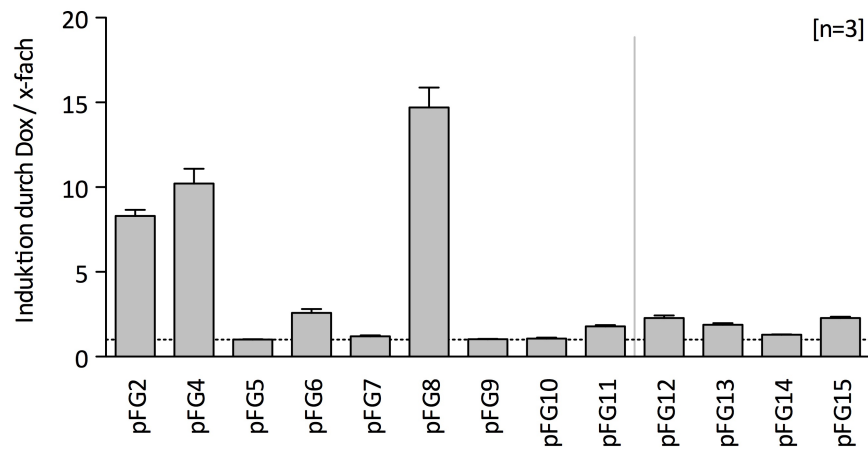


Abbildung 3.21 Auswirkung der Intronposition auf die Induzierbarkeit des Systems.

Luziferase-Assay in Hek-293-Zellen, welche mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und $\pm 50 \mu\text{M}$ Dox behandelt wurden. Die gepunktete horizontale Linie stellt den Wert dar, an dem keine Regulation stattfindet (=1). Die durchgezogene vertikale Linie grenzt die Konstrukte mit größter Sequenzähnlichkeit zu pFG2 ab. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Für pFG8 und pFG11 wurde, wie für pFG2 in Kapitel 3.2.5, die Äquivalenz zwischen relativen Luziferase-Werten und (q)RT-PCR-Analysen gezeigt. Die Daten hierzu sind im Anhang in Abbildung 6.6 zu finden.

Da die basale Aktivität von pFG4 und pFG8 wesentlich niedriger war als pFG2, wurde trotz besserem Schalfaktor mit pFG2 weitergearbeitet. Der komplette Datensatz zu diesem Experiment ist im Anhang in Tabelle 6.2 zu finden.

3.2.8 Variation der relativen Aptamerposition

Die relative Aptamerposition innerhalb einer Expressionsplattform hat großen Einfluss auf die Funktionalität und nur bestimmte Positionen könnten im Hinblick auf den hypothetischen Wirkmechanismus, basierend auf der sterischen Hinderung des Spleißosoms, funktional sein.

Deshalb wurde der relative Abstand des TetR-Aptamers zur 5'-Spleißstelle variiert. Beginnend von Position 1, die 2 nt hinter der 5'-SS lag, wurde sukzessive das Aptamer innerhalb des Introns Richtung 3'-Ende verschoben. Dies wurde von Position 1 bis 9 nukleotidweise getan. Die Abstände 10 und 11 wurden weiter hinten gewählt. Die Positionen sind in der Übersicht in Abbildung 3.22 dargestellt. Die Zuordnung der Konstrukte zu den verschiedenen Positionen ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Luziferase-Assays der entsprechenden Konstrukte ist in Abbildung 3.23 zu zusammengefasst.

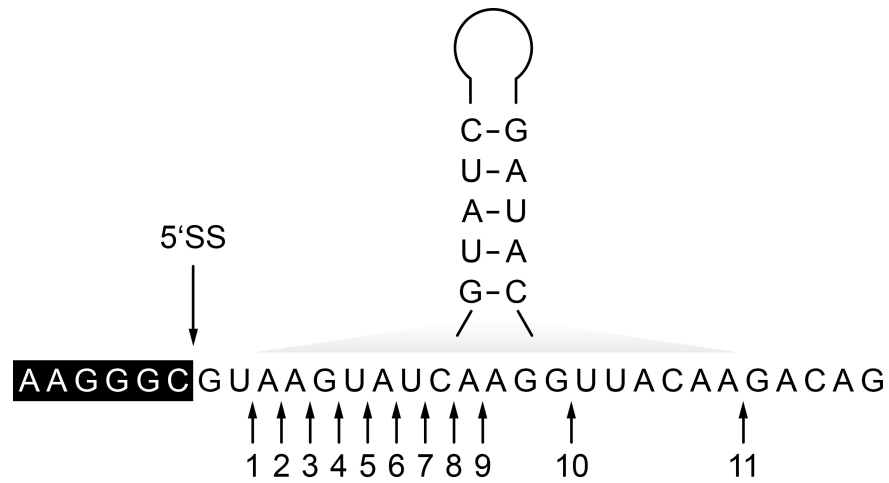


Abbildung 3.22 Übersicht über die getesteten relativen Aptamerpositionen.

Ausschnitt aus der Sequenz von pDLP_CI. Schwarz hinterlegt sind Teile der *luc2*-mRNA, darauf folgend die Sequenz des chimären Introns. Die 5'SS ist mit einem Pfeil markiert, genauso wie die getesteten Aptamerpositionen. Darüber ist ein Teil des Stammes des TetR-Aptamers abgebildet.

Tabelle 3.3 Zuordnung der verschiedenen Positionen zu den klonierten Plasmiden.

Bezeichnung	Position ^a	Abstand zur 5'-SS / nt
pFG17	1	2
pFG18	2	3
pFG19	3	4
pFG20	4	5
pFG2	5	6
pFG21	6	7
pFG22	7	8
pFG23	8	9
pFG24	9	10
pFG25	10	13
pFG26	11	19

^a Die hier genannte Position 5 entspricht der relativen Aptamerposition die in pFG2 zu finden ist.

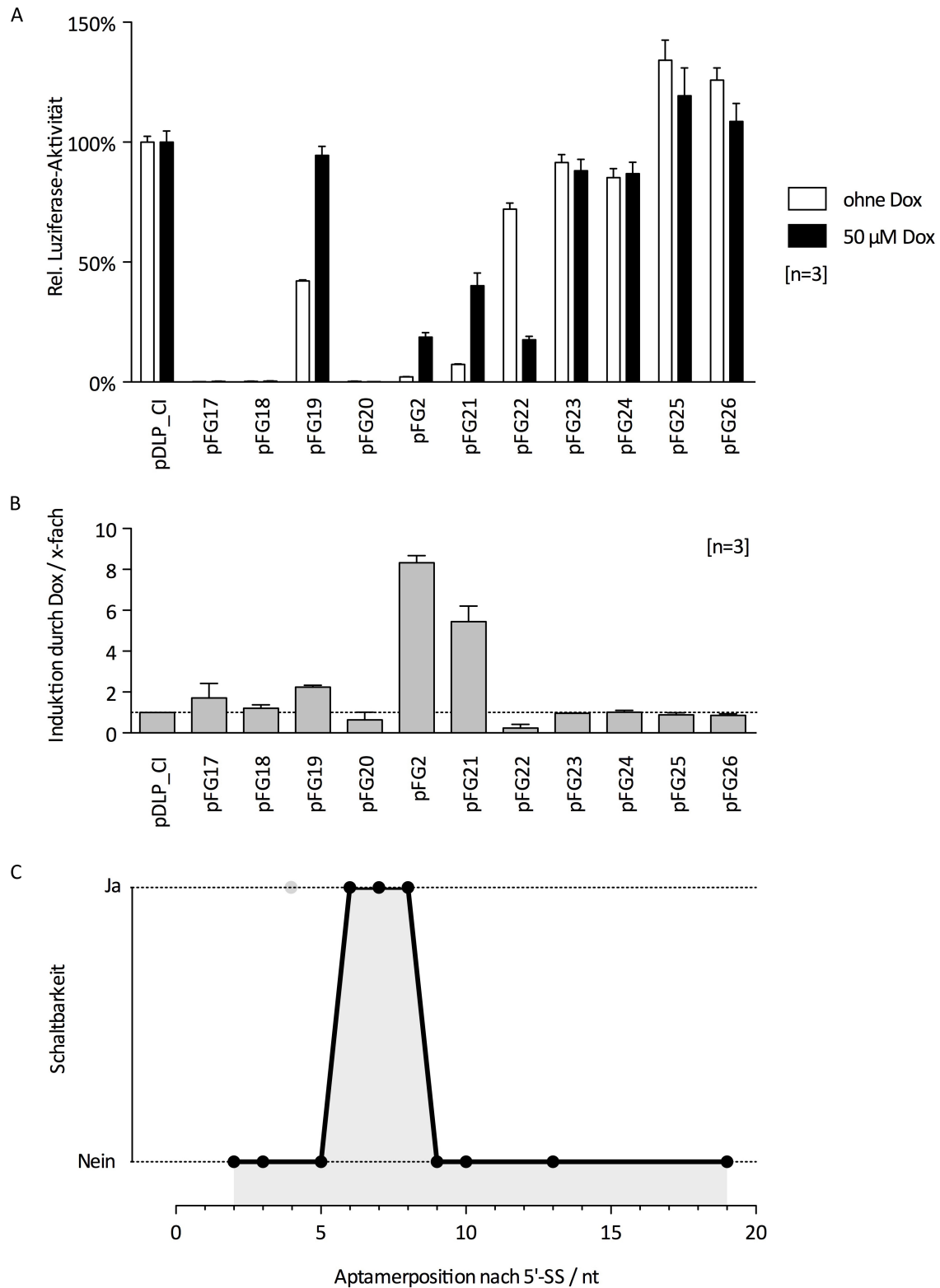


Abbildung 3.23 Einfluss der relativen Aptamerposition auf die Schaltbarkeit.

Die angegebenen Plasmide wurden für Luziferase-Assays in Hek-293-Zellen transfiziert. **A.** Dargestellt ist die relative Luziferase-Aktivität in An- und Abwesenheit von 50 µM Dox. Die Daten sind normiert auf pDLP_CI. Die Reihenfolge der Konstrukte entspricht der fortlaufenden Nummerierung. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. **B.** Darstellung der aus den in A abgeleiteten Regulationsfaktoren durch Induktion durch 50 µM Dox. Die horizontale, gepunktete Linie zeigt regulatorisch nicht aktive Konstrukte an. **C.** Abhängig von den Schaltfaktoren in B. wurden die Konstrukte in zwei Gruppen eingeteilt. Die Gruppe „Ja“ besaß Regulationsfaktoren über bzw. unter 2. Zwischen -2 und 2 wurden die Konstrukte in die Gruppe „Nein“ eingeordnet. Auf Grund der Besonderheit von pFG19 (siehe Fließtext), wurde dieser für diese Darstellung ausgeklammert (grau hinterlegt). Es zeichnet sich ein Bereich hinter der 5'SS ab, in dem das Aptamer regulatorisch aktiv ist.

Wurde das Aptamer von pFG2 ausgehend in Richtung 5'SS gerückt, ging sowohl die regulatorische Aktivität sowie die Expression verloren. Die Ausnahme bildete hier pFG19, welches durch das Aptamer die verdrängte Spleißstelle exakt wieder herstellte (siehe Abbildung 3.22, Schema). Somit wurde in diesem Fall das Intron wieder erkannt und ein Regulationsfaktor von 2,2-fach erreicht. Wurde das Aptamer weiter stromabwärts inseriert (ab pFG23), verlor das Aptamer seine regulatorische Aktivität. Die basale Expression wurde nicht beeinflusst.

Betrachtet man die Konstrukte pFG2 und pFG21, bei denen das Aptamer 6 bzw. 7 nt nach der 5'SS inseriert wurde, ergibt sich ein ähnliches Bild: Durch Applikation von Dox wurde die relative Luziferase-Aktivität heraufreguliert (8,3- bzw. 5,5-fach). Das Konstrukt pFG22, welches das Aptamer 8 nt hinter der 5'SS inseriert hatte, zeigte interessanterweise keine Heraufregulation, sondern eine Abschaltung des Riboregulators durch 50 μ M Dox um -4,2-fach (Abbildung 3.23 A). Die Frage, was aus dem AN-Schalter (pFG2) einen AUS-Schalter (pFG22) macht, wird momentan durch strukturanalytische Untersuchungsmethoden geklärt. Erste Ergebnisse von *in-line probing*-Experimenten, welche Aufschluss über die Sekundärstruktur der beiden Konstrukte im natürlichen Kontext der *luc2*-mRNA geben, sind im Anhang in Abbildung 6.5 zu finden. Der Effekt des positionsabhängigen Umkehrens des regulatorischen Effektes sollte in einem weiteren Intron überprüft werden. Hierzu wurde in den Konstrukten pFG2, pFG21 und pFG22 das CI durch das β -Globin Intron 2 ausgetauscht. Der Effekt konnte in den Konstrukten mit β -Globin Intron 2 nicht reproduziert werden (Daten im Anhang in Abbildung 6.3), was darauf hindeutet, dass die lokale Umgebung im CI einen entscheidenden Einfluss auf diesen Effekt hat.

Um die Daten zusammenzufassen, wurden die Konstrukte basierend auf ihren Regulationsfaktoren in zwei Gruppen eingeteilt. Die Konstrukte, die einen Regulationsfaktor über bzw. unter 2 hatten wurden in die Gruppe „Schaltbarkeit: Ja“, Plasmide mit dazwischenliegenden Regulationsfaktoren wurden in die Gruppe „Schaltbarkeit: Nein“ eingeordnet. Trägt man diese Gruppeneinteilung nun gegen die relative Aptamerposition zur 5'SS in Nukleotiden auf, so ergibt sich ein enger Bereich hinter der 5'SS in der das Aptamer regulatorisch aktiv ist (Abbildung 3.23 C).

3.2.9 Stammstabilität und –länge des TetR-Aptamers

Als weitere Optimierung des Riboregulators sollte die Stammstabilität und –länge des Aptamers variiert und untersucht werden. Die Stammstabilität beeinflusst bei Riboswitchen maßgeblich die bevorzugte Struktur im sowohl Ligand-gebundenen als auch ungebindenem Zustand und ist verantwortlich für die Plastizität und letztendlich auch für die Schaltbarkeit des Systems.

Da Stammstabilität und –länge zusammenhängen, werden drei verschiedene Ansätze in diesem Kapitel analysiert:

1. Die Verlängerung des Aptamerstammes durch Mutation der hinter dem Aptamer liegenden Sequenz, sodass diese mit der 5'SS sukzessive paaren kann,
2. die schrittweise Verkürzung des Stammes und
3. die Destabilisierung des Aptamerstammes durch Mutation der G-C Basenpaare zu G-U Basenpaare (Wobble-Paarung).

Um Ansatz 1 umzusetzen, mussten 8 nt mutiert werden, welche direkt hinter dem Aptamer gelegen sind, da diese teilweise mit der 5'SS paaren konnte. Basis hierfür waren die Vorhersagen der Sekundärstruktur die durch den Zuker-Algorithmus mittels mFold erstellt wurden^{123,124}. Die Nukleotidabfolge, die gewählt wurde, um den Wildtyp zu mutieren,

zeigte keinerlei Wechselwirkung mit der 5'SS. Nun wurde beginnend mit Plasmid pFG27, das keinerlei Basenpaarung mit der 5'SS aufweist, stückweise die mutierte Sequenz in die komplementäre Sequenz überführt, sodass bei pFG31 der Stamm eine maximale Interaktion mit der 5'SS zeigte (Abbildung 3.24).

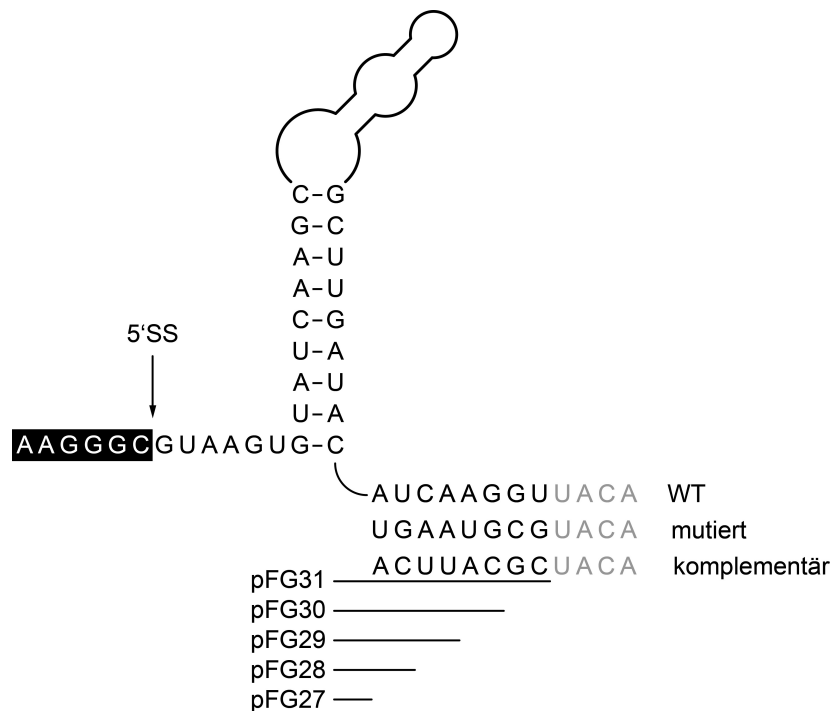


Abbildung 3.24 Schematische Darstellung der Konstrukte pFG27 – pFG31.

Die stromabwärts des Aptamers gelegenen Nukleotide konnten im Wildtyp (Wt) schwache Basenpaarungen mit der 5'SS eingehen (Wt-Sequenz hinter Aptamer in schwarzer Schrift). Um dies zu unterbinden wurde die Wt-Sequenz mutiert, sodass keine Basenpaarung mehr möglich war. Dies wurde überprüft durch die Vorhersagen der Sekundärstruktur die durch den Zuker-Algorithmus mittels mFold erstellt wurden. Die Sequenz, die sich in Konstrukt pFG27 hinter dem Aptamer befindet, zeigt keine Interaktion mit der 5'SS. Von pFG28 bis pFG31 wurden jeweils 2 nt von der mutierten Sequenz zur komplementären Sequenz überführt, sodass bei pFG31 die Interaktion, als auch der Aptamerstamm, maximal wurden.

Für Ansatz 2 wurde ausgehend von pFG27 der Stamm des TetR-Aptamers schrittweise verkürzt, wie in Abbildung 3.25 dargestellt ist. pFG32 fehlt das schließende G-C Basenpaar, pFG33 und pFG34 sind um 3 bzw. 5 Basenpaare kürzer als pFG27. Sekundärstrukturvorhersagen für die Konstrukte pFG33 und pFG34 zeigten, dass sich das Aptamer auf Grund des kurzen Stammes nicht mehr falten kann. Diese Vorhersagen beziehen sich auf das TetR-Aptamer im Liganden-ungebundenen Zustand und Bindung von TetR könnte zur Stabilisierung des Aptamers beitragen.

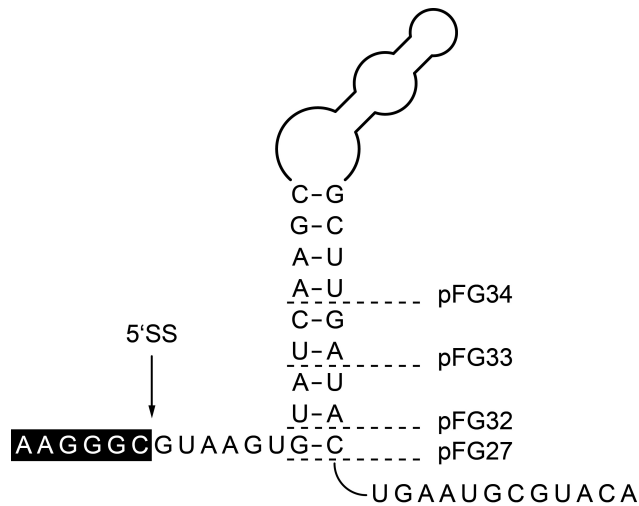


Abbildung 3.25 Schematische Darstellung der Konstrukte pFG32 – pFG34.

Von pFG27 ausgehend wurde der Stamm um je 1 bp (pFG32), 3 bp (pFG33) bzw. 5 bp (pFG34) verkürzt. Die dargestellte Sekundärstruktur ist schematisch. Die Sekundärstrukturvorhersage von pFG33 und pFG34, unter Einbeziehen von 50 Nukleotiden stromaufwärts und stromabwärts, zeigte, dass sich das Aptamer nicht mehr faltete im Liganden-ungebundenen Zustand.

In Ansatz 3 wurde das Konstrukt pFG27 destabilisiert, in dem G-C Basenpaare durch G-U Basenpaare ausgetauscht wurden. Bei den Konstrukten pFG35 – pFG38 wurde jeweils ein G-C Basenpaar ausgetauscht wie in Abbildung 3.26 zu sehen ist. Bei pFG39 wurden alle in rot angegebenen G-C Basenpaare durch Wobble-Basenpaare ausgetauscht.

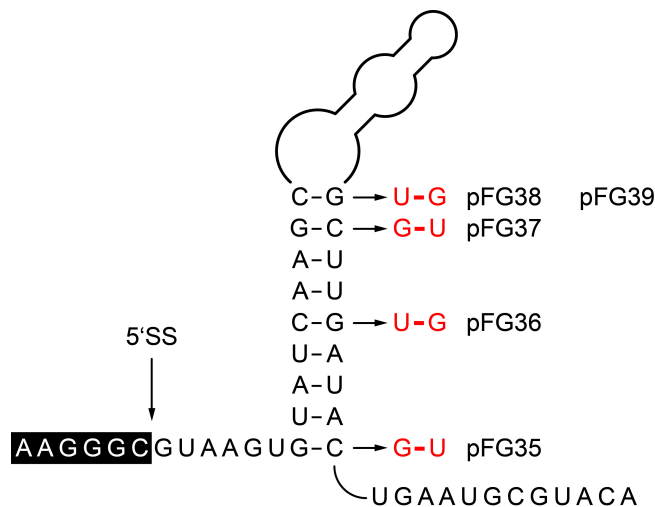


Abbildung 3.26 Schematische Darstellung der Konstrukte pFG35 – pFG39.

Von pFG27 ausgehend wurde in den Konstrukten von pFG35 bis pFG38 je ein G-C Basenpaar durch ein G-U Basenpaar ausgetauscht. pFG39 enthält alle G-C- zu G-U-Mutationen.

Die Sequenzen der Stämme sowie die berechneten ΔG -Werte sind in Tabelle 3.4 zu finden. Die ΔG -Werte wurden auf Basis der Algorithmus von Zuker *et al.* unter Verwendung des Programmes RNAcofold aus dem Vienna-Paket bestimmt.

Tabelle 3.4 Übersicht über die Stämme und der berechneten ΔG -Werte.

Bezeichnung	Stamm 5' (5'→3') ^a	Stamm 3' (5'→3') ^a	ΔG (kcal/mol) ^b
pFG2	GUAUCAAGC	GCUUGAUAC	-11,45
pFG27	GUAUCAAGC	GCUUGAUAC	-11,45
pFG28	GUGUAUCAAGC	GCUUGAUACAC	-15,73
pFG29	AAGUGUAUCAAGC	GCUUGAUACACUU	-18,72
pFG30	GUAAGUGUAUCAAGC	GCUUGAUACACUUAC	-22,20
pFG31	GCGUAAGUGUAUCAAGC	GCUUGAUACACUUACGC	-27,41
pFG32	UAUCAAGC	GCUUGAUA	-8,94
pFG33	UCAAGC	GCUUGA	-6,46
pFG34	AAGC	GCUU	-2,36
pFG35	GUAUCAAGC	GCUUGAUAU	-10,34
pFG36	GUAUUAAGC	GCUUGAUAC	-9,25
pFG37	GUAUCAAGC	GUUUGAUAC	-9,04
pFG38	GUAUCAAGU	GCUUGAUAC	-10,26
pFG39	GUAUUAAGU	GUUUGAUAU	-3,75

^a zwischen der Sequenz des 5'- und des 3'-Stammes, welche zueinander komplementär sind, liegt die Bindetasche für TetR und der terminale Loop mit der Sequenz 5'-AGCAUGUUAUGGGUCAUCACAGACCAGAGAAAA-3'.

^b ΔG -Werte wurden berechnet auf Basis der Algorithmus von Zuker *et al.* unter Verwendung des Programmes RNAcofold aus dem Vienna-Paket¹²⁴. Die ΔG -Werte entsprechen der minimalen freien Energie (MFE)¹⁰⁹.

Mit zunehmender Stammlänge (pFG27 – pFG31) nehmen auch die ΔG -Werte kontinuierlich zu. Durch Einbringen einzelner G-U Basenpaare verändert sich die freie Energie minimal. Erst bei vier mutierten G-C Basenpaare ist eine stärkere Positivierung des ΔG -Wertes zu verzeichnen.

Die Daten zu den Luziferase-Assays zu den vorgestellten Konstrukten sind in Abbildung 3.27 dargestellt.

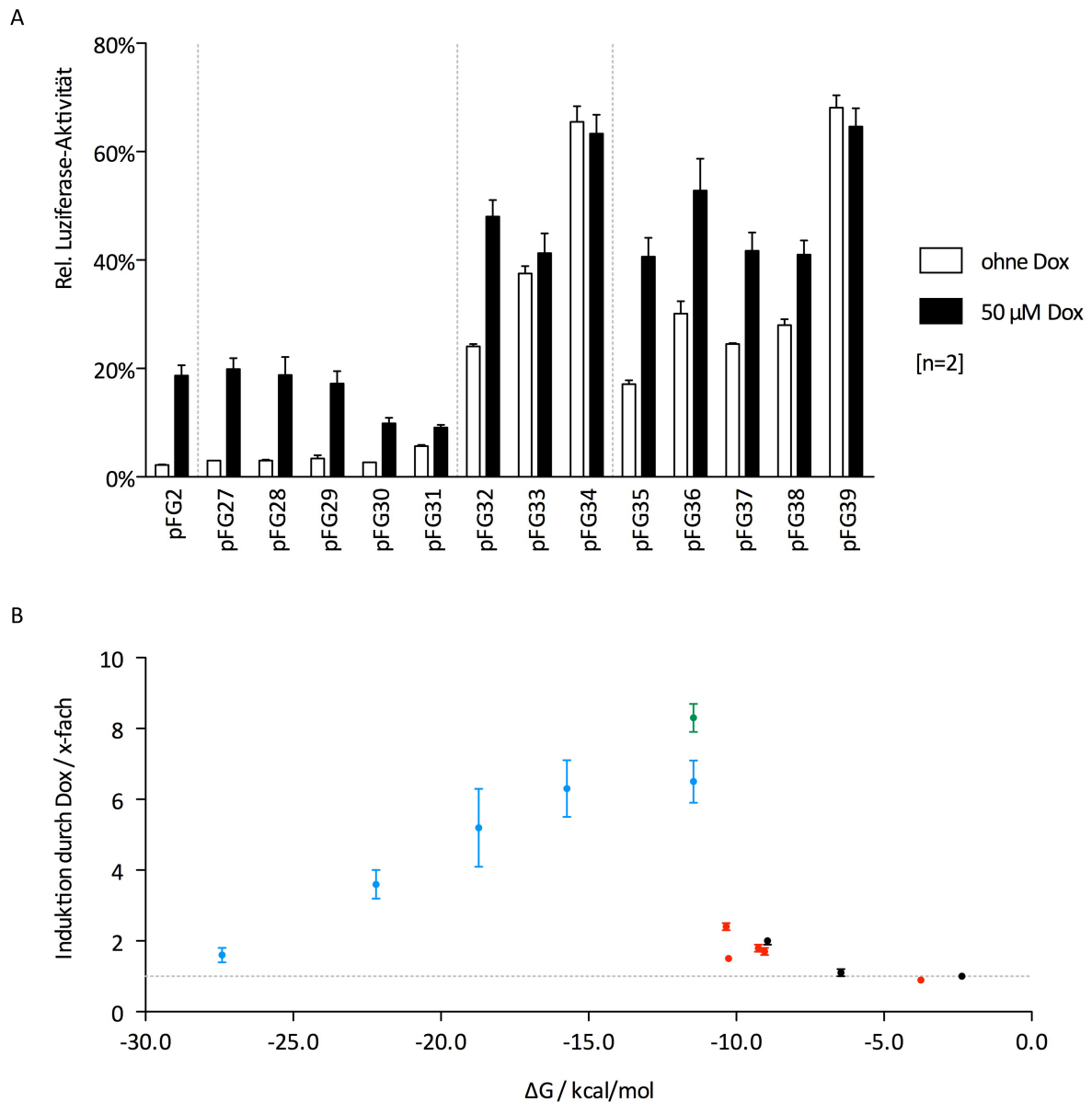


Abbildung 3.27 Einfluss der Stammstabilität und –länge auf die Schaltbarkeit.

Das Luziferase-Assay wurde mit Hek-293-Zellen, welche mit den angegebenen Plasmiden transfiziert wurden, in An- und Abwesenheit von 50 µM Doxycyclin durchgeführt. **A.** Relative Luziferase-Aktivität der angegebenen Konstrukte. Gepunktete, vertikale Linien trennen die drei Ansätze. Als Referenz ist pFG2 aufgetragen. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten **B.** Dargestellt sind die berechneten ΔG -Werte der einzelnen Konstrukte gegen ihren Regulationsfaktor (Induktion durch ± 50 µM Dox). Die einzelnen Ansätze sind farbig hervorgehoben: Ansatz 1 in blau, Ansatz 2 in schwarz, Ansatz 3 in rot und pFG2 in grün. Die horizontale, graue Linie kennzeichnet den Punkt an dem keine Regulation stattfindet (=1).

In Ansatz 1 konnte man beobachten, dass die Zunahme der Stammlänge zuerst kaum einen Einfluss auf die Schaltbarkeit und die basalen Expressionen hatte (pFG27 – pFG29). Erst nach Erniedrigung des ΔG -Wertes auf unter -20 kcal/mol reduzierte sich zuerst die Luziferase-Aktivität des AN-Zustandes (+50 µM Dox) und dann auch die des AUS-Zustandes (ohne Dox), sodass die Schaltbarkeit des Systems verloren ging. Die Regulationsfaktoren von pFG27 – pFG29 sind mit ca. 6-fach vergleichbar zu denen in pFG2.

Die Verkürzung des Stammes in Ansatz 2 von pFG32 bis pFG34 führte zur Erniedrigung bzw. zum Verlust der Regulierbarkeit und zu einer Erhöhung der basalen Expression sowohl im AN- als auch im AUS-Zustand. Hier hat sich

gezeigt, dass das Konstrukt pFG32, welches pFG27 bzw. pFG2 am ähnlichsten ist, noch einen Regulationsfaktor von 2-fach aufweist.

Auch die Destabilisierung des Stammes von pFG27 (Ansatz 3) reduzierte schrittweise die Induktion durch Dox. Die Einfachmutanten pFG35 – pFG38 zeigten ein ähnliches Verhalten wie pFG27 bei erhöhter basaler Expression (im Vgl. zu pFG27). Die Regulationsfaktoren lagen im Bereich von 2,4- bis 1,5-fach. Bei pFG39, welche alle Mutationen enthielt, war keine regulatorische Aktivität festzustellen. Festzuhalten ist hier die fehlende regulatorische Aktivität bei 65%iger basaler Expression.

3.2.10 Spezifität des Riboregulators

Nach Optimierung des Riboregulators sollte die Spezifität des Systems gezeigt werden. Hierfür wurden zwei Punktmutationen in das TetR-Aptamer eingeführt. Wie bereits über Sättigungsmutagenese herausgefunden wurde, ist die Bindetasche für TetR absolut invariabel⁹⁰. In dieser Region lagen die beiden eingeführten Punktmutationen (siehe Abbildung 3.28 A). Die Klonierung von pFG2_mut ist im Kapitel 5.1.2.6 zu finden. Bei der Mutation des Aptamers wurde darauf geachtet, dass die Vorhersage der Sekundärstruktur des Aptamers und der umliegenden Bereiche (± 50 bp) unverändert blieb. Somit sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten Effekte nicht auf einer veränderten Struktur des Bereichs um die 5'SS zurückzuführen ist. Die Ergebnisse des Luziferase-Assays von pFG2 und pFG2_mut sind in Abbildung 3.28 B dargestellt.

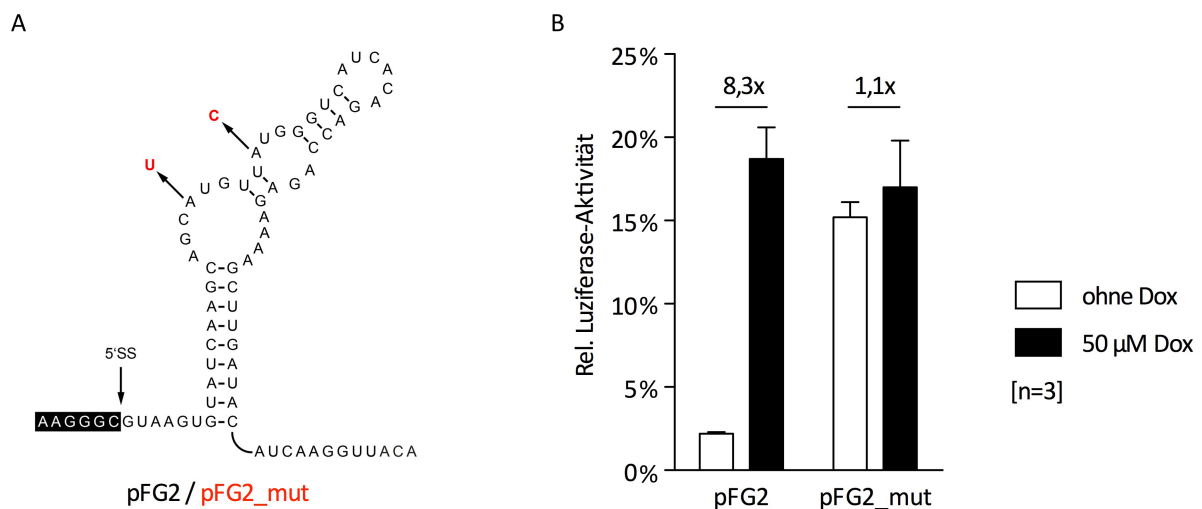


Abbildung 3.28 Verlust der Schaltbarkeit durch Mutation des Aptamers.

A. Schematischen Darstellung des Aptamers im Kontext von pFG2. Die eingeführten Punktmutationen, die zu pFG2_mut führen, sind in rot eingezeichnet. Der Austausch von Nukleotiden innerhalb der Bindetasche für TetR führt zum Verlust der Bindeeigenschaften des Aptamers⁹⁰. **B.** Daten des Luziferase-Assays. Hek-293-Zellen wurden mit pFG2 bzw. pFG2_mut transfiziert und mit ± 50 µM Doxycyclin behandelt. Die relativen Luziferase-Aktivitäten wurden erhalten durch Normierung auf pDLP_CI. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Doppelmutation der Bindetasche des TetR-Aptamers führte zum Verlust der Schaltbarkeit. Der Regulationsfaktor fiel von 8,3- auf 1,1-fach ab. Hierbei sind die relativen Luziferase-Aktivitäten in Anwesenheit von 50 µM Dox identisch. Da wie zu erwarten, nur der AUS-Zustand durch die Bindung von TetR an das Aptamer beeinflusst wird, ist die Änderung des

Regulationsfaktors hauptsächlich auch auf eine Änderung der relativen Luziferase-Aktivität in Abwesenheit von Dox zustande gekommen.

3.2.11 Relative Menge TetR- zu Reporter-gen-Plasmid

Wie eingangs beschrieben, wurde das Reporter-gen-Plasmid immer in einem Verhältnis von 1:2 zum TetR-Expressionsplasmid pCMV_NLS_TetR eingesetzt. Die Optimierungen des Aptamers ging meist mit einer Erhöhung des AN-Zustandes einher. In diesem Zustand ist durch die Konformationsänderung von TetR das Aptamer im ungebundenen Zustand. Im Umkehrschluss ist der AUS-Zustand (ohne Dox) abhängig von der TetR-Bindung. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, wie sich pFG2 verhält, wenn der relative Anteil von pCMV_NLS_TetR erhöht wird. Getestet wurden folgende Verhältnisse: 1:0,5, 1:1, 1:2 (Standard), 1:4 und 1:8 (entspricht der maximal mögliche Menge an zu transfizierender DNA). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 3.29 dargestellt.

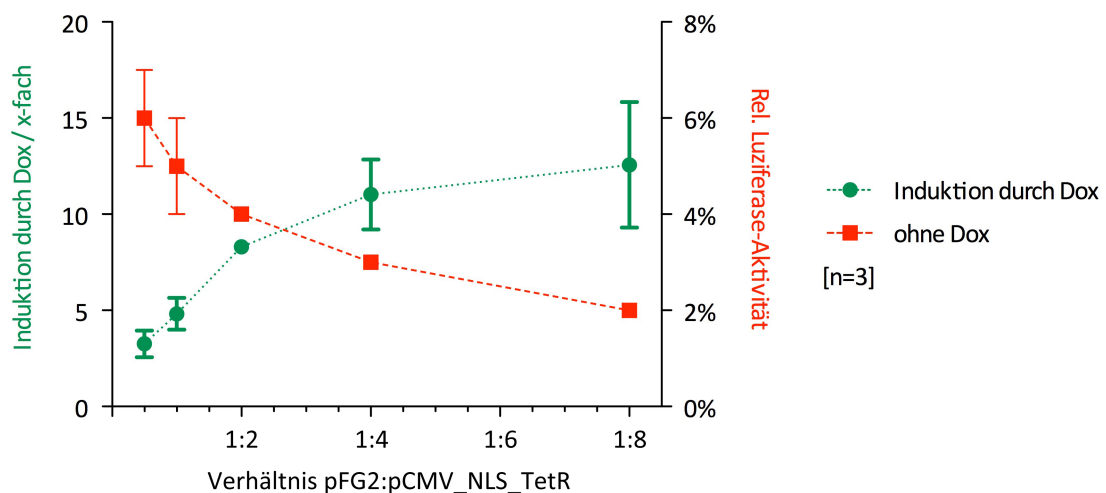


Abbildung 3.29 Einfluss der Menge an pCMV_NLS_TetR auf den AUS-Zustand von pFG2.

Dargestellt sind die verschiedenen Verhältnisse von Reporter (pFG2) zu TetR-Expressionsplasmid (pCMV_NLS_TetR) gegen die Induktion durch Dox (grün, linke Y-Achse) bzw. gegen die relative Luziferase-Aktivität von pFG2 ohne Dox (rot, rechte Y-Achse). Der Übersicht halber sind die Luziferase-Daten mit 50 μ M Dox nicht abgebildet. Diese sind im Anhang in Tabelle 6.4 aufgelistet. Die Experimente wurden in Triplikaten ausgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Mit steigender Menge pCMV_NLS_TetR sank die relative Luziferase-Aktivität in Abwesenheit von Dox ab. Die Luziferase-Aktivität in Anwesenheit von 50 μ M Dox blieb hingegen konstant (Daten im Anhang in Tabelle 6.4). Daraus resultierend stieg der Regulationsfaktor von 3,3-fach bei einem Verhältnis von 1:0,5 an auf 12,6-fach bei einem maximalen Verhältnis von 1:8.

3.2.12 Induktion des Systems durch Doxycyclin

Bei der Kontrolle eines genetischen Systems ist nicht nur der AN- bzw. der AUS-Zustand von Interesse, sondern auch die Möglichkeit, diesen graduell zu steuern. Deshalb wurde das Plasmid pFG2 in Hek-293-Zellen transfiziert und mit steigenden Konzentrationen Dox behandelt. Nach Normierung der Werte auf pDLP_CI wurde der niedrigste bzw. der

höchste Wert in den Plateaus auf 0 bzw. auf 100% gesetzt. Die erhaltenen Werte wurden mit der Hill-Gleichung (*one site specific binding with hill slope*) unter Verwendung von Prism (Graphpad) gefittet. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 3.30 abgebildet.

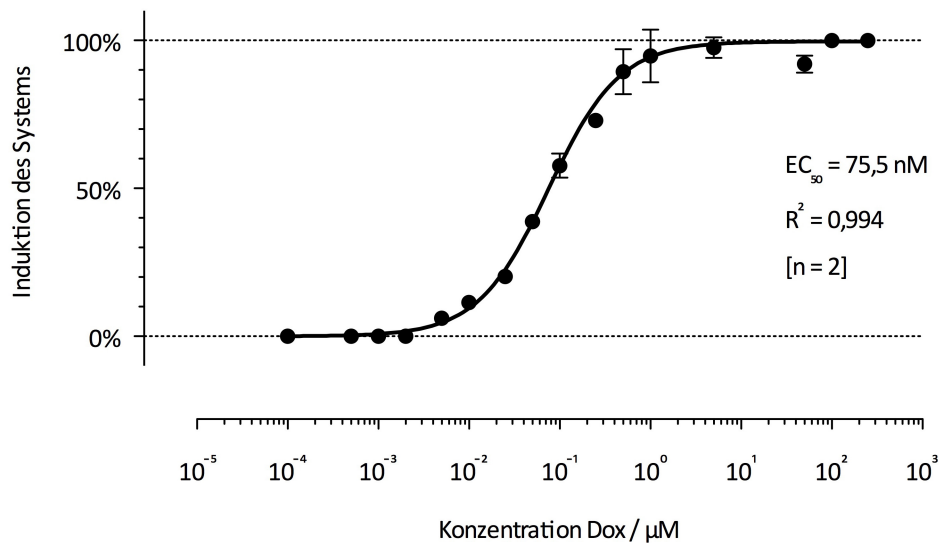


Abbildung 3.30 Konzentrationsabhängige Induktion des Systems.

Das Plasmid pFG2 wurde in Hek-293-Zellen transfiziert und mit steigenden Mengen Dox behandelt. Nach Normierung auf pDLP_CI wurde der niedrigste Wert auf 0% und der höchste Wert auf 100% gesetzt. Die Punkte wurden mit der Hill-Gleichung (*one site specific binding with hill slope*) unter Verwendung von Prism (Graphpad) gefittet. Die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) berechnete sich auf 75,5 nM, der Hill-Koeffizient lag bei 1,1 und das Bestimmtheitsmaß betrug 0,994. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

Beginnend von 2 nM Dox konnte das System dosisabhängig aktiviert werden, bis es bei 5 µM die maximale Aktivität erreichte. Höheren Dox-Konzentrationen hatten keinen weiteren Effekt auf das System. Aus dem Verlauf der Kurve konnte eine mittlere effektive Konzentration von 75,5 nM errechnet werden. Der Hill-Koeffizient betrug 1,1. Die Verwendung von 50 µM Dox in den bisherigen Experimenten hatte, wie schon in Vorversuchen bestätigt wurde, eine 100% Aktivierung des Systems gewährleistet¹¹⁶.

3.2.13 Regulation weiterer Introns

Die Regulationseinheit aus chimärem Intron und TetR-Aptamer zeigte sehr gute Resultate. Wie in Kapitel 3.2.8 schon erwähnt wurde, konnte auch das β -Globin Intron 2 erfolgreich in diesem System verwendet werden.

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob das System auch für drei Introns, die eine wichtige Rolle bei der Granulozytenentwicklung spielen, angewendet werden können. Motivation hierfür war die Beobachtung, dass Intronretention nicht nur eine Folge von Miss-Spleißen ist, sondern in der Zelle auch regulatorische Funktionen ausübt. Dies wurde durch Wong *et al.* 2013 durch eine Studie zu Intronretention während der Granulopoese in Mäusen (und Mensch) gezeigt¹²⁵. Die Retention von bestimmten Introns führt zur Herabregulation bestimmter Genprodukte, welche für die Granulopoese verantwortlich sind. Aus diesem Grund wurden die Introns *ATF* Intron 4, *EIF1* Intron1 und *LBR* Intron 9 ausgewählt, welche in genannter Studie am stärksten reguliert wurden. Alle verwendeten Gene wurden aus gDNA von Hek-293-Zellen amplifiziert und mit der Nukleotid-Datenbank von NCBI abgeglichen¹²⁶. Details zur Klonierung sind im Kapitel 5.1.2 zu finden, die Sequenzen der verwendeten Introns sind im Anhang Kapitel 6.6 gelistet. Das Intron und das TetR-Aptamer wurden analog zu pFG2 innerhalb des *luc2*-Gens platziert. Die konstruierten Plasmide pFG46 (*ATF* Intron 4), pFG47 (*EIF1* Intron1), pFG48 (*LBR* Intron 9) und pFG49 (β -Globin Intron 2) sowie die zugehörigen Plasmide ohne Aptamerdomäne (pFG46_oA bis pFG49_oA) wurden in Hek-293-Zellen transfiziert, in An- und Abwesenheit von 50 μ M Dox kultiviert und für Luziferase-Assays und RT-PCR-Analysen verwendet. Für die RT-PCR-Analysen wurden die Oligonukleotide *Luc2_fwd6* und *Luc2_rev2*, für die β -Actin-PCR wurde die Oligonukleotide *Actin_99bp_fwd* und *Actin_99bp_rev* verwendet.

Tabelle 3.5 Zusammenstellung der bestimmenden Intronsequenzen.

Intron	Exon I 5'SS	Intron 5'SS	Intron 3'SS	Exon II 3'SS
Chimäres Intron	AAGGGC	GTAAGT	CCACAG	CCAGCG
ATF Intron 4	AAGGGC	GTGAGT	ATTCAG	CCAGCG
EIF1 Intron 1	AAGGGC	GTAAGC	TTTCAG	CCAGCG
LBR Intron 9	AAGGGC	GTATGT	TTTCAG	CCAGCG
β-Globin Intron 2	AAGGGC	GTGAGT	CCACAG	CCAGCG

Gezeigt sind die verschiedenen Sequenzen der Introns, die innerhalb des Luziferase-Gens mit TetR-Aptamer platziert wurden. Exon I und Exon II stellen die Sequenz des *luc2*-Gens vor bzw. nach dem Intron dar. Des Weiteren sind die Sequenzen der 5'SS und 3'SS des Introns gezeigt. Die Insertionsstelle des Aptamers ist 6 nt nach der 5'SS, also folgend auf die Sequenz „Intron 5'SS“.

Die relativen Luziferase-Werte, die davon abgeleiteten Induktionen der Konstrukte sowie die zugehörigen RT-PCR-Analysen sind in Abbildung 3.31 zu finden.

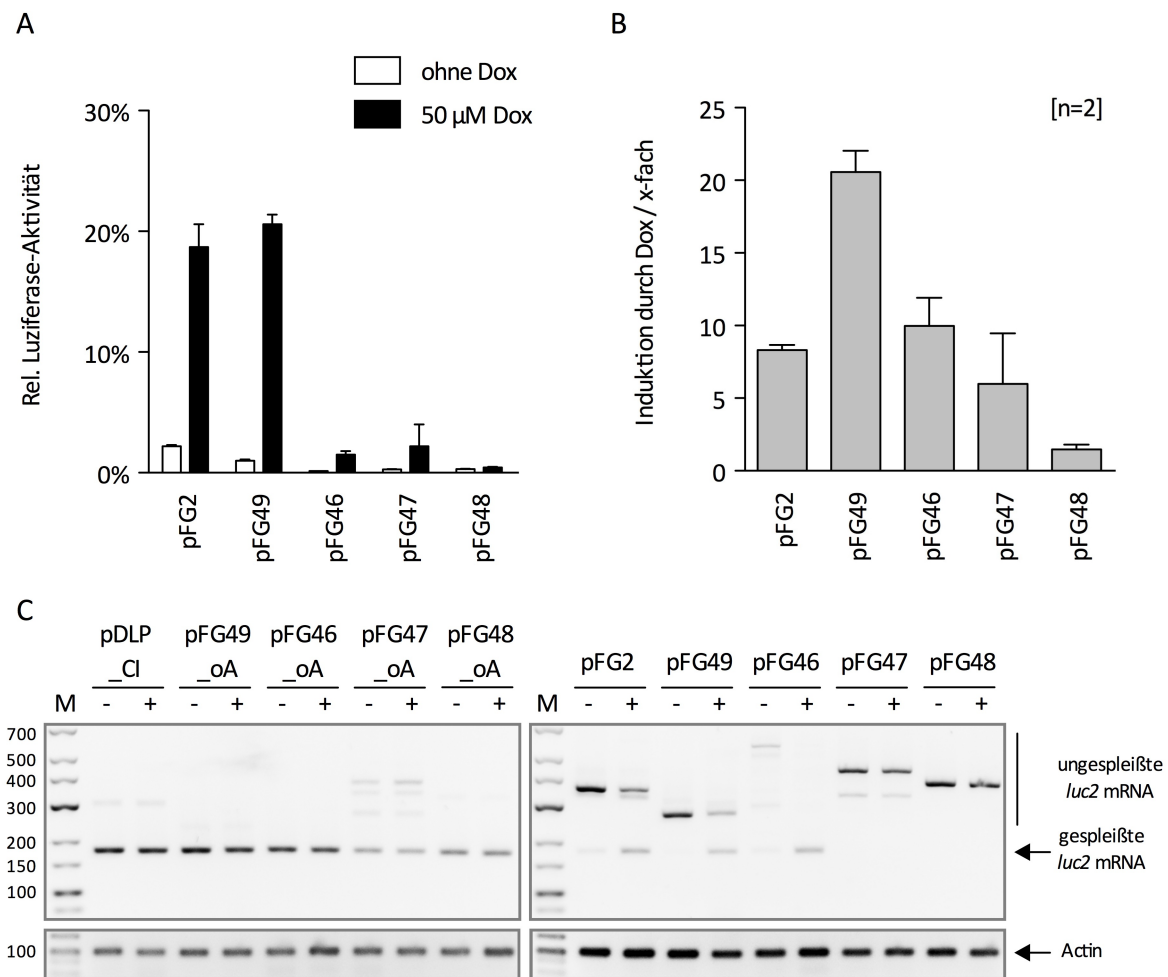


Abbildung 3.31 Applikation des TetR-Aptamers in weiteren Introns.

Hek-293-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten in An- und Abwesenheit von 50 µM Dox transfiziert und sowohl für Luciferase-Assays, als auch für RT-PCR-Analysen eingesetzt. **A.** Relative Luciferase-Aktivität der angegebenen Konstrukte. Jedes Konstrukt wurde mit dem entsprechenden Konstrukt ohne Aptamer normiert (pDLP_CI, pFG49_oA, pFG46_oA – pFG48_oA). **B.** Aus den relativen Luciferase-Aktivitäten abgeleiteten Induktionen durch Applikation von 50 µM Dox. **C.** RT-PCR-Analysen der entsprechenden Konstrukte ohne Aptamer (links) und mit Aptamer (rechts). Oberes Panel: PCR mit *Luc2_fwd6* und *Luc2_rev2* (da das Gel über 700 bp keine Signale zeigten, wurde dieser Teil des Gels nicht dargestellt); unteres Panel: Actin-PCR mit *Actin_99bp_fwd* und *Actin_99bp_rev*. M steht für die DNA-Leiter Ultra Low Range II, die entsprechenden Größen sind angegeben. Alle gezeigten Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Die Konstrukte, welche keine Aptamerdomäne enthielten, zeigten hauptsächlich Signale auf Höhe der gespleißten *luc2*-mRNA (Abbildung 3.31, C links). Das Intron 1 des *EIF1*-Gens (pFG47_oA) zeigte zu kleinen Teilen unspezifische Signale über der zu erwartenden Bande der gespleißten *luc2*-mRNA. Das Kontrollkonstrukt pFG2 zeigte ohne Dox wenig gespleißte *luc2* mRNA. Durch Zugabe von 50 µM Dox kam es zu einer Zunahme der gespleißten Bande. Ausgehend von den Luciferase-Aktivitäten von pFG2 sind die Daten diesbezüglich homogen. Für das β -Globin Intron 2 (pFG49) sehen die Ergebnisse der RT-PCR-Analysen ähnlich aus: Durch Zugabe von Dox wird eine Zunahme der gespleißten Form des *luc2*-Gens sichtbar. Die Signale darüber auf der Höhe von ca. 270 bp stellen nicht die ungespleißte Form dar. Das β -Globin Intron 2 sollte, wenn retentiert, eine Bande bei ca. 1050 bp erzeugen (im oberen Teil des Gels über 700 bp konnten keine Signale detektiert werden und es wurde der Übersicht halber abgeschnitten). Dies war nicht der Fall. Die entstandenen

Banden wurden ausgeschnitten, über das CloneJET PCR Cloning Kit kloniert und im Anschluss sequenziert. Es zeigte sich, dass hier eine alternative 5'SS verwendet wurde und dass das TetR-Aptamer in diesem Fall die Wahl der Spleißstelle beeinflusste (die alternative 5'SS ist im Sequenzausschnitt in Abbildung 3.32 dargestellt). Das Ergebnis auf Ebene der Luziferase-Aktivität stimmt dennoch mit den Daten der RT-PCR-Analyse überein und Induktionen durch Dox von 20,6-fach konnten beobachtet werden. Für die restlichen Introns passte das Spleißmuster in der RT-PCR-Analyse nicht mit dem zu erwartenden überein. In allen Fällen wurden kleinere ungespleißte *luc2*-mRNA-Derivate gefunden. Die Bandenintensitäten der gespleißten Form der Firefly-Luziferase waren gering. Dies spiegelte sich auch in den niedrigen, relativen Luziferase-Aktivitäten wider. Während pFG48 (*LBR* Intron 9) keine Regulation zeigte, konnten bei pFG46 (*ATF* Intron 4) und pFG47 (*EIF1* Intron1) Regulationsfaktoren von 10- und 6-fach gefunden werden. Die zu erwartenden Fragmente der einzelnen Konstrukte sind in Tabelle 3.6 zu finden.

Tabelle 3.6 Zu erwartende Fragmentgrößen in der RT-PCR-Analyse.

Plasmid	Beschreibung	Gespleißt / bp ^a	Ungespleißt / bp ^a
pDLP_CI	Chimäres Intron	176	309
pFG2	Chimäres Intron + Aptamer	176	360
pFG49_oA	β-Globin Intron 2	176	1026
pFG49	β-Globin Intron 2 +Aptamer	176	1077
pFG46_oA	ATF Intron 4	176	775
pFG46	ATF Intron 4 + Aptamer	176	826
pFG47_oA	EIF1 Intron1	176	884
pFG47	EIF1 Intron1 + Aptamer	176	935
pFG48_oA	LBR Intron 9	176	1096
pFG48	LBR Intron 9 + Aptamer	176	1147

^a Die in der RT-PCR-Analyse zu erwartenden Fragmentgrößen unter Verwendung der Oligonukleotide Luc2_fwd6 und Luc2_rev2.

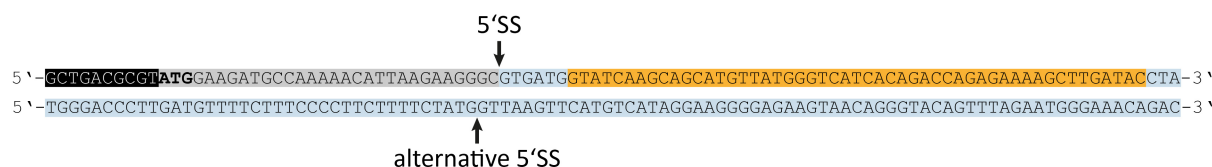


Abbildung 3.32 Alternative 5'SS, die in pFG49 bei TetR-Überexpression genutzt wird.

Dargestellt ist ein Sequenzausschnitt aus pFG49. Gezeigt sind Teile des 5'UTR (schwarz hinterlegt mit weißer Schrift), das Exon I der Firefly-Luziferase (grau hinterlegt) mit Start-Codon (fett), das β-Globin Intron 2 (blau hinterlegt) und das TetR-Aptamer (orange hinterlegt). Die konstitutive 5'SS sowie die alternative 5'SS sind durch Pfeile kenntlich gemacht.

3.2.14 Anwendungen

Die Anwendbarkeit des Riboregulators sollte unter Verwendung zweier Gene, die den zellulären Prozess der Apoptose steuern, demonstriert werden. Hierfür wurde der B-Zell-Oberflächenmarker CD20 und die Thymidinkinase (Tk) des Herpes-Simplex-Virus (HSV), genauer die hyperaktive Variante Tk39¹²⁷, verwendet.

Das Oberflächenprotein CD20 ist auf fast allen normalen und malignen B-Zellen exprimiert und stellt das Epitop für das Krebsmedikament Rituximab dar. Rituximab ist ein humanisierter, monoklonaler Antikörper, dessen Bindung an die extrazelluläre Domäne von CD20 die Apoptose auslöst (zusammengefasst im Übersichtsartikel ¹²⁸). Der genaue Mechanismus der Induktion sowie dem Ablauf der Apoptose durch das Rituximab-CD20-Konjugat sind noch nicht gänzlich geklärt. Die Zugabe von Teilen des Komplementsystems in Form von Hasenretikulocyten-Extrakt erwies sich als hilfreich bei der Apoptose-Induktion¹²⁹.

Die HSV-Tk phosphoryliert die pharmakologischen Vorläufer (*prodrug*) Ganciclovir (GCV) bzw. Aciclovir (ACV) zur monophosphorylierten Form (GCV und ACV sind in Abbildung 3.33 dargestellt). Diese können im Weiteren durch zelleigene Kinasen in die dreifachphosphorylierte Form überführt werden. Bei proliferierenden Zellen werden die dreifachphosphorylierten Derivate von GCV und ACV (dGTP-Analoga) während der DNA-Replikation in die DNA eingebaut. Dies führt zur Termination der Replikation¹³⁰. Gehäufte Fehler während der Replikation führen dann zur Apoptose der Zelle. Die verwendete, hyperaktive Variante der Thymidinkinase Tk39 besitzt einen IC₅₀-Wert, der mit 0,11 µM für ACV mehr als 182-fach bzw. mit 0,017 µM für GCV 294-fach niedriger ist als die des Wildtyps¹²⁷. Durch Verwendung der Tk39 sollte eine effizientere und höhere Apoptoserate erreicht werden als mit dem Wildtyp.

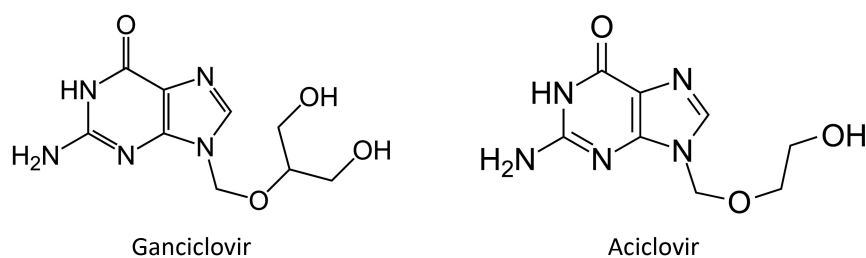


Abbildung 3.33 Chemische Struktur von GCV und ACV^{131,132}.

Ein allgemeines Schema für die Verwendung beider Gene zur nachgeschalteten Apoptoseinduktion ist in Abbildung 3.34 dargestellt. Der Riboregulator wird analog zum Reporter-Gen-System innerhalb der CDS beider Gene inseriert werden. Die Co-Transfektion mit TetR führt letzten Endes in An- bzw. Abwesenheit von Dox entweder zur gespleißten bzw. ungespleißten Variante. In Anwesenheit von Dox kann nach Herauspleißen des Riboregulators aus der CDS eine größere Proteinmenge produziert werden, als in Abwesenheit von Dox. Die unterschiedlichen Mengen an CD20- bzw. Tk39-Protein werden dann genutzt, um durch den Induktor (Rituximab bei CD20, GCV/ACV bei Tk39) die Apoptose zu induzieren.

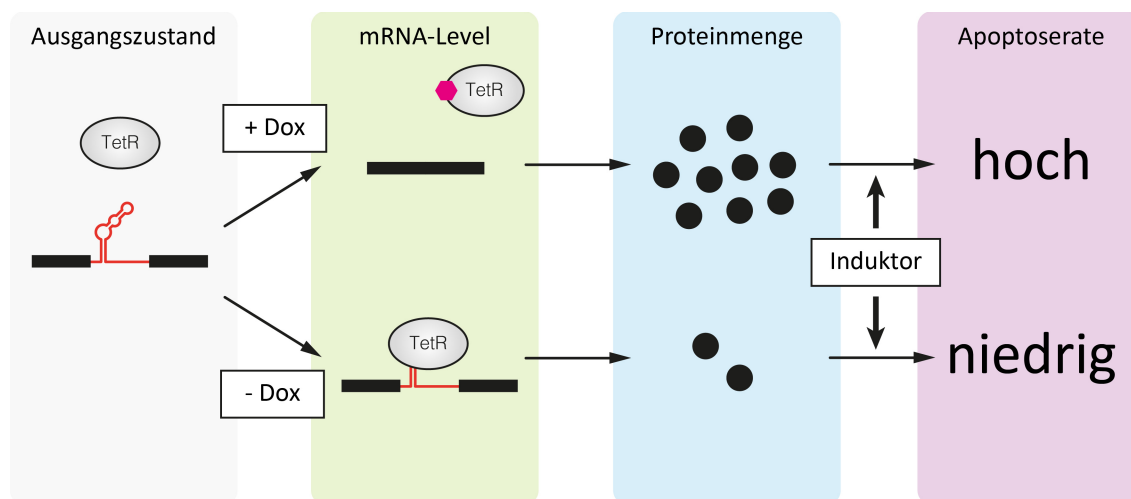


Abbildung 3.34 Schematischer Ablauf der durch den Riboregulator gesteuerten Apoptoseinduktion.

Im Ausgangszustand werden die CD20- bzw. Tk39-Konstrukte mit pCMV_NLS_TetR Co-transfiziert. Durch Applikation von Dox wird der Riboregulator (rote Linie) herausgespleißt und die vollständige CDS (schwarzes Rechteck) wird wieder hergestellt. In Abwesenheit von Dox wird das Intron retentiert und es kommt zu einem vorzeitigen Stopp der Translation. Die unterschiedlichen Mengen an Protein, die von der Zelle hergestellt werden können, werden durch Zugabe des Induktors (Rituximab bei CD20, GCV/ACV bei Tk39) übersetzt in unterschiedliche Apoptoseraten.

3.2.15 Platzierung des Riboregulators in CD20 und Tk39

CD20 als auch Tk39, wurden in das Plasmidrückgrat von pFRT überführt (Klonierungsdetails sind in Kapitel 5.1.2 zu finden). Dieses besitzt neben einem CMV-Promotor und einem Replikationsursprung für *E. coli* sowie einer Ampicillinresistenz auch eine FRT-Sequenz, mit Hilfe derer sich das Plasmid genomisch stabil integrieren lässt¹³³. Die genomische Integration sollte nach erfolgreichen Tests im transienten System angewandt werden.

Der in beide Gene inserierte Riboregulator, welcher das chimäre Intron und das TetR-Aptamer beinhaltet, war identisch mit dem in pFG2. Die Insertionsstellen innerhalb von CD20 und Tk39 wurden nach Ähnlichkeit zu dem in pFG2 gewählt und sind in Tabelle 3.7 aufgelistet. Für Tk39 wurden zwei Insertionsstellen getestet.

Tabelle 3.7 Insertionsstellen des Riboregulators in CD20 und Tk39.

Gen	Position	Sequenz vor ^a	Sequenz nach ^a
luc2 (pFG2)	-	AAGGGC	CCAGCG
CD20	-	AAGGGC	CCCATC
Tk39	1	CGCGGC	CATAGC
	2	TGGGGC	CCTTCC

^a Dargestellt sind die Sequenzen des Gens, die vor bzw. nach der Insertionsstelle des Riboregulators liegen. Zum Vergleich ist pFG2 gelistet.

In Tabelle 3.8 sind die Plasmide aufgelistet, die für dieses Projekt kloniert wurden (Klonierungsdetails sind im Kapitel 5.1.2 zu finden). Neben dem chimären Intron sollte auch das β -Globin Intron 2 in der Thymidinkinase getestet werden, da dies im Luziferase-Assay gute Ergebnisse erzielte.

Tabelle 3.8 Übersicht über die klonierten Plasmide mit CD20- bzw. Tk39-Gen.

Plasmid	Position	Beschreibung
pFRTCD20	-	CD20-Gen hinter CMV-Promotor
pFRTCD20-cmv	-	CD20-Gen ohne CMV-Promotor
pFRTCD20_CI	-	CD20-Gen mit chimärem Intron
pFRTCD20_FG2	-	CD20-Gen mit chimärem Intron und TetR-Aptamer
pFRTTK	-	Tk39-Gen hinter CMV-Promotor
pFRTTK_CI	P1 & P2	Tk39-Gen mit chimärem Intron
pFRTTK_FG2	P1 & P2	Tk39-Gen mit chimärem Intron und TetR-Aptamer
pFRTTK_BgIII	P1 & P2	Tk39-Gen mit β -Globin Intron 2
pFRTTK_FG49	P1 & P2	Tk39-Gen mit β -Globin Intron 2 und TetR-Aptamer

3.2.16 CD20-Vorversuch: Westernblot

In einem Vorversuch sollte geklärt werden in wieweit der Riboregulator die Expression von CD20 kontrolliert und wie stark der Dox-abhängige Effekt ist. Zu diesem Zweck wurden Hek-293-Zellen mit den pFRTCD20-Konstrukten und einem 8-fachen Überschuss pCMV-NLS_TetR transfiziert und für einen Westernblot eingesetzt. Als zusätzlicher Größenstandard dienten Raji-Zellen, welche konstant CD20 exprimieren¹³⁴. Als Ladekontrolle diene Hsp60. Die Präparation von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen, die Messung des Proteingehaltes mittels Bradford und der Ablauf des Westernblots sind in Kapitel 5.2.9, 5.2.10 und 5.2.11 zu finden. Die verwendeten Erst- und Zweitantikörper in Tabelle 5.4. Der Nachweis beider Antikörper erfolgte über HRP-konjugierte Zweitantikörper unter Verwendung einer

chemilumineszenz-Reaktion (Kapitel 5.2.11). Der Westernblot und dessen Quantifizierung sind in Abbildung 3.35 dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte durch die Aufsummierung der Pixelintensitäten der einzelnen Signale unter Verwendung der Software ImageLab (BioRad). Die quantifizierten Bandenintensitäten wurden auf Hsp60 normiert und dann auf „pFRTCD20_CI -Dox“ bezogen.

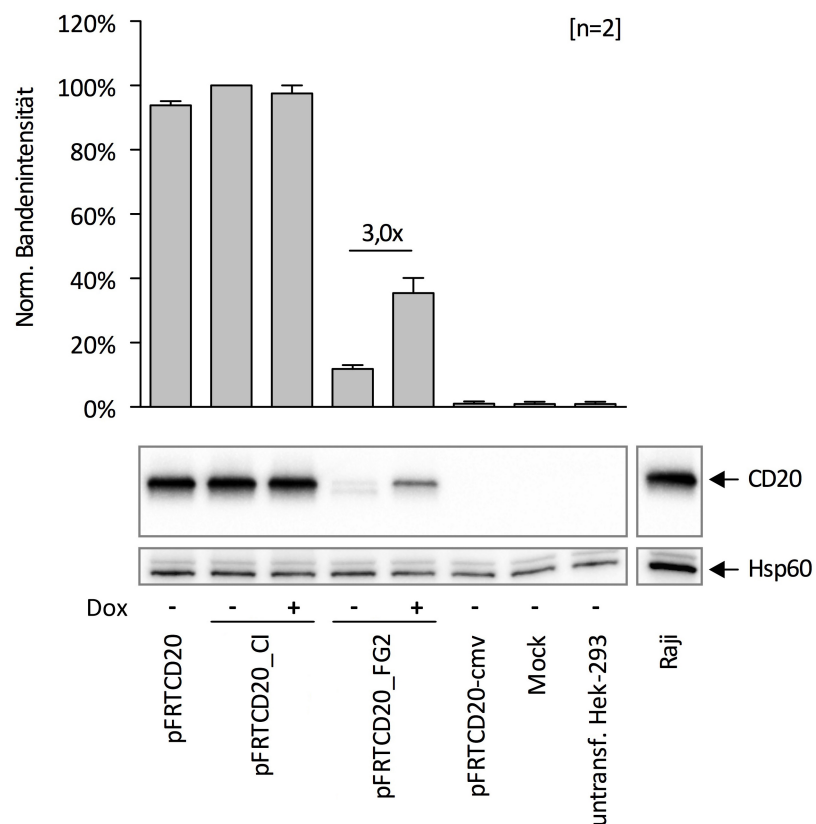


Abbildung 3.35 Kontrolle von CD20 durch den Riboregulator.

Oben. Quantifizierung der Signalintensitäten des im unteren Teil der Abbildung gezeigten Westernblots. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung der auf „pFRTCD20_CI ohne Dox“ normierten Daten aus drei unabhängigen Experimenten. **Unten.** Nachweis der Proteinmenge von CD20 und Hsp60 mittels Westernblot. Als Größenstandard diente zusätzlich Raji-Zell-extrakt in dem CD20 konstant exprimiert wurde.

Die Zugabe von 50 μ M Dox änderte die Expression von pFRTCD20_CI nicht. Somit war auch in diesem System nicht davon auszugehen, dass die TetR-Expression oder Dox-Behandlung unspezifische Nebeneffekte auslösen. Weiterhin war aus dem Experiment ersichtlich, dass das Einbringen des chimären Introns in die CDS von CD20 nur einen marginalen Einfluss auf die basale Expression hatte. Die Kontrollen pFRTCD20-cmv, Mock-transfiziert (nur pCMV_NLS_TetR und Leervektor) sowie untransfizierte Hek-293-Zellen zeigten im Westernblot auf Höhe von CD20 kein Signal, lediglich einen sehr schwachen Hintergrund mit ca. 1%. Der Riboregulator pFRTCD20_FG2 konnte Dox-abhängig die Menge an exprimierten CD20 um den Faktor 3 verändern. Die niedrigere basale Expression konnten hier auch beobachtet werden, jedoch war diese nicht so stark ausgeprägt wie im Luziferase-System (Vgl. Kapitel 3.2.6).

3.2.17 Induktion der Apoptose durch Rituximab

Nachdem auf Proteinebene gezeigt wurde, dass der Riboregulator die Menge von CD20 um den Faktor 3 beeinflusst, sollte nun in einem ersten Ansatz die Apoptose durch Rituximab ausgelöst werden. Die Zellviabilität sollte durch

Propidiumiodid-Färbung und anschließende Durchflusszytometrie bestimmt werden. Propidiumiodid (PI) ist wie Ethidiumbromid ein Nukleinsäureinterkalator und in der Lage, genomische DNA in Zellen anzufärben, falls diese keine intakte Zellmembran mehr besitzen¹³⁵. Absterbende oder tote Zellen lassen sich somit wesentlich besser anfärben als lebendige. Durch die FACS-gestützte Auswertung konnte so jeder untersuchten Zelle ein Wert für die PI-Färbung zugewiesen werden. Das Absorptions- und Emissions-Maximum von PI verschiebt sich von 488 & 590 nm durch DNA-Bindung zu 535 & 617 nm¹³⁶. Dies überlappte zu kleinen Teilen mit dem Spektrum von Dox (Spektrum ist im Anhang in Abbildung 6.4 zu finden) und musste am FACS-Gerät gegeneinander kompensiert werden. Für das Experiment wurden Hek-293-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert ($\pm 50 \mu\text{M}$ Dox). 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Hasenretikulozyten-Extrakt (15% (v/v)) und Rituximab (10 $\mu\text{g/ml}$ Medium) behandelt und 2 h bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach mechanischem Ablösen der adhären-wachsenden Hek-293-Zellen wurden diese mittels PI gefärbt und an einem Durchflusszytometer ausgewertet (PI-Färbung ist in der Literatur bereits beschrieben worden¹³⁷). Die zusammengefassten Daten sind in Abbildung 3.36 zu sehen. Da im Laufe des Experiments (Transfektion und Rituximab-Behandlung) Zellen auf natürliche Weise oder durch die mechanische Beanspruchung absterben und PI ein gewisses Maß an unspezifischer Färbung zeigt¹³⁸, wurde als Hintergrund der Fluoreszenzwert von mit pFRTCD20-cmv transfizierten Zellen abgezogen. Danach wurden die PI-positiven (PI+) Zellen in den mit pFRTCD20_CI transfizierten Zellen auf 100% gesetzt. Durchgeführt wurden die Arbeiten am Georg-Speyer-Haus (Frankfurt a.M.) unter Anleitung von Prof. Dr. Manuel Grez und Dr. Stefan Stein.

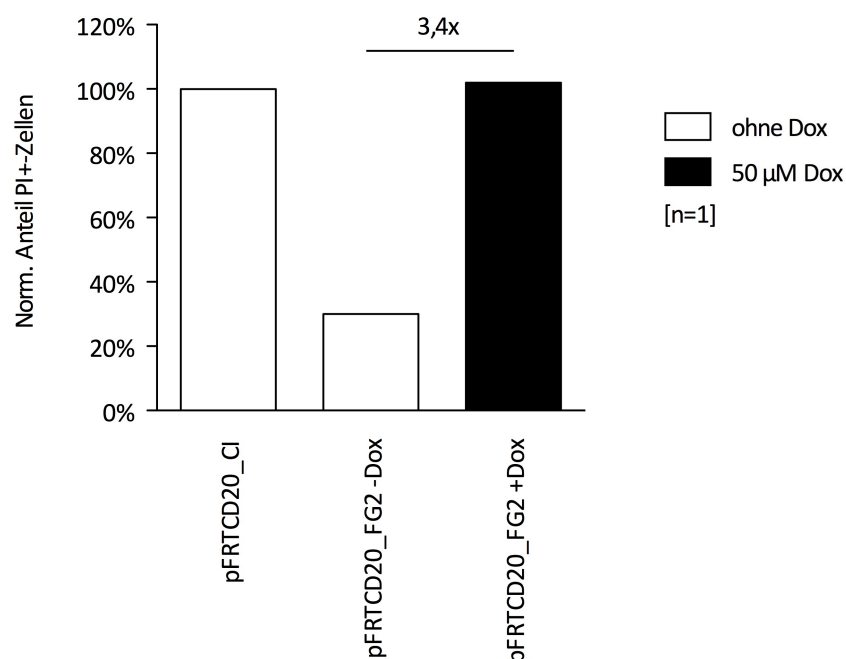


Abbildung 3.36 Anteil der PI+-Zellen nach Rituximab-Behandlung.

Nach Transfektion von Hek-293-Zellen mit den angegebenen Konstrukten, wurden diese in Ab- bzw. Anwesenheit von 50 μM Dox kultiviert. 24 h nach Transfektion wurde diese mit Rituximab und Hasenretikulozyten-Extrakt behandelt, für weitere 2 h inkubiert und schließlich PI gefärbt. Die Bestimmung des Anteils der PI+-Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Auf Grund der mechanischen Beanspruchung der Zellen und der teils unspezifischen Färbung von PI, wurden die Fluoreszenzwerte von mit pFRTCD20-cmv transfizierten Zellen als Hintergrund von allen anderen Werten subtrahiert und anschließend auf pFRTcd20_CI -Dox normiert. Dargestellt sind die Messwerte aus einem Experiment. Da die Daten am Ende dieser Studie generiert wurden, konnten sie bis dato nicht reproduziert werden. Die Reproduktion dieses Experiments wird in den kommenden Monaten durchgeführt werden.

Durch Gabe von 50 μ M Dox wurde eine Zunahme der PI-positiven Zellen von 30% auf 102% festgestellt. Somit wurde nicht nur eine Beeinflussung der Apoptoserate von 3,4-fach erreicht, sondern auch durch Dox-Applikation eine genauso starke Induktion der Apoptose wie im Vergleichskonstrukt pFRTCD20_CI erreicht. Die Daten stehen auch im Einklang mit den vorherigen Ergebnissen der Westernblots (Kapitel 3.2.15).

Auf diese vielversprechenden ersten Ergebnisse hin wird in den kommenden Monaten das Experiment reproduziert. Parallel dazu werden die Konstrukte genomisch stabil integriert werden. Dies soll nicht nur das Experiment vereinfachen, sondern auch die Ergebnisse positiv beeinflussen, da auf eine Transfektion verzichtet werden kann und eine definierte Anzahl an Expressionskassetten pro Zelle vorliegen wird.

3.2.18 HSV-Tk39-Vorversuch: qRT-PCR

In einem ersten Ansatz sollte durch qRT-PCR gezeigt werden, dass der Riboregulator auf mRNA-Ebene schaltet. Hierfür wurden alle pFRTTK-Konstrukte an Position 1 und 2 in Hek-293-Zellen transfiziert. Nach RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurde durch qRT-PCR die Menge an totaler Tk39-mRNA und gespleißter Tk39-mRNA mit denen in Tabelle 3.9 angegeben Oligonukleotidkombinationen quantifiziert.

Tabelle 3.9 Oligonukleotidkombinationen zum Nachweis der totalen/gespleißten Menge Tk39-mRNA.

Position	Totale Menge Tk39-mRNA	Gespleißte Menge Tk39-mRNA
1	TK_Spleiß_fwd + TK_total_rev	TK_Spleiß_fwd + TK_gespleißt_rev
2	TK_Spleiß_fwd2 + TK_total_rev2	TK_Spleiß_fwd2 + TK_gespleißt_rev2

Die Oligonukleotide TK_gespleißt_rev und TK_gespleißt_rev2 binden hier die Exon/-Exon-Grenze und weisen spezifisch die gespleißte Form der Tk39-mRNA nach. Die Menge an β -Actin-mRNA wurde mit den Oligonukleotide Actin_99bp_fwd und Actin_99bp_rev nachgewiesen. Nach abgelaufener PCR wurde die Spezifität der Amplifikate durch Schmelzkurvenanalyse bestätigt. Die Daten wurden unter Verwendung der $\Delta\Delta$ CT-Methode ausgewertet¹¹⁷. Die Genexpression der Konstrukte ohne Aptamer wurden dabei auf 1 gesetzt, um die relative Veränderung durch das Einbringen des Aptamers und die Wirkung von Dox zu sehen. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse ist in Abbildung 3.37 zusammengestellt.

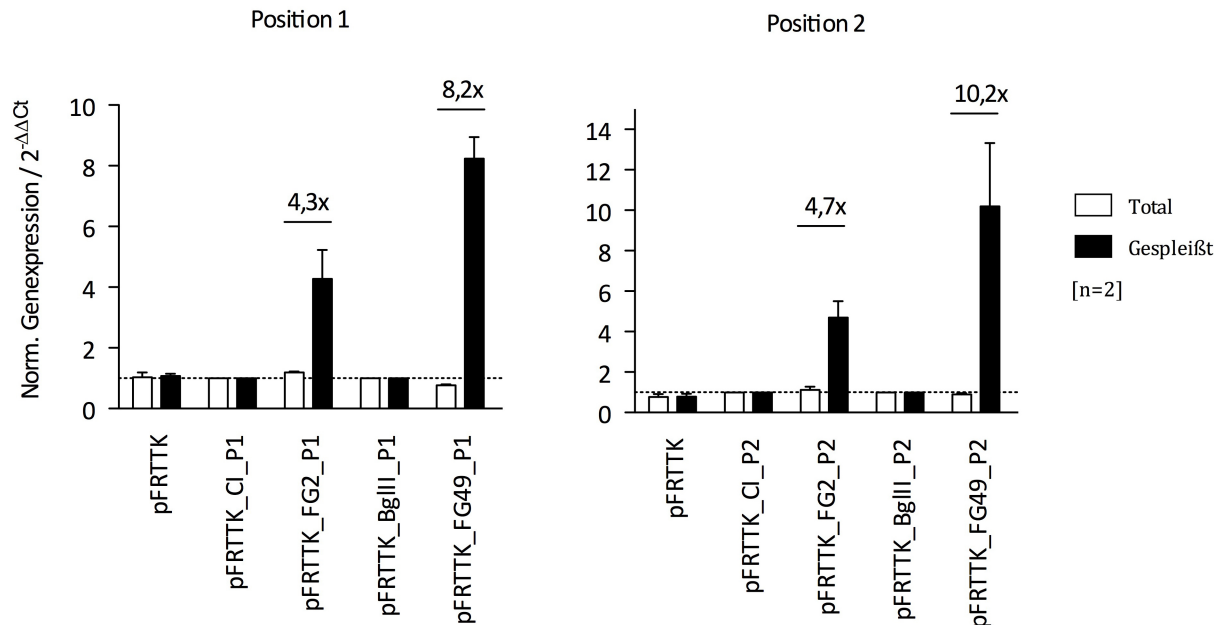


Abbildung 3.37 Kontrolle von Tk39 durch den Riboregulator.

Abgebildet sind die normalisierten Genexpressionen der einzelnen Konstrukte, welche auf die relative Gesamtmenge (Total) und relative Menge gespleißter Tk-mRNA (Gespleißt) in Abhängigkeit von 50 μ M Doxycyclin untersucht wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus je zwei unabhängigen Experimenten.

Aus den qRT-PCR-Daten war nicht nur ersichtlich, dass der Riboregulator sowohl an Position 1 und Position 2 für beide getesteten Introns funktionierte, sondern auch, dass weder die Insertion des Introns noch die Applikation von Dox einen ungewünschten Effekt auf die Expression der Gesamtmenge von Tk39-mRNA noch auf das Verhältnis von gespleißter zu ungespleißter mRNA hatte. Für das TetR-Aptamer im chimären Intron konnte an Position 1 ein Regulationsfaktor von 4,3-fach und an Position 2 ein Regulationsfaktor von 4,7-fach erreicht werden. Für das TetR-Aptamer im β -Globin Intron 2 konnten 8,2-fache und 10,2-fache Regulationsfaktoren erzielt werden.

Da für beide Introns an beiden Positionen fast identische Regulationsfaktoren gefunden werden konnten, Position 1 aber der relativen Position des Introns innerhalb des Gens entspricht wie sie in Konstrukt pFG2 zu finden ist, wurde im weiteren Verlauf mit den Konstrukten an Position 1 weitergearbeitet. Zusätzlich waren Modifikationen der Sequenz der Konstrukte an Position 1 weitaus einfacher durchzuführen als an Position 2.

3.2.19 Induktion der Apoptose durch ACV und GCV

Da die qRT-PCR-Daten zeigten, dass der Riboregulator auch in dem Tk39-Kontext schaltete, sollte nun mittels GCV die Apoptose induziert werden. Hierfür wurden Hek-293-Zellen mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und $\pm 50 \mu$ M Dox sowie einem GCV-Gradienten (0, 1, 10 und 100 μ M) für 3 Tage kultiviert, bevor die Zellviabilität (alamarBlue, siehe Kapitel 5.2.2.4) bestimmt wurde. Von den Zellviabilitätswerten wurde der Hintergrund (nur Medium) abgezogen, danach wurden die 0 μ M GCV-Werte je Konstrukt auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.38 oben zu sehen.

GCV zeigte in keiner der verwendeten Konzentrationen toxische Eigenschaften auf die Zelle (Abbildung 3.38 oben links). Auch die gleichzeitige Applikation von GCV und Dox führt nicht zu einer Beeinflussung der Zellviabilität. Betrachtete man die Konstrukte mit dem chimären Intron (pFRTTK_CI_P1, pFRTTK_FG2_P1), so war kein Unterschied zwischen dem

Konstrukt ohne und mit Aptamerdomäne und auch kein Unterschied zwischen \pm Dox festzustellen. Bei den Konstrukten mit dem β -Globin Intron 2 zeichnete sich ein kleiner Effekt zwischen pFRTTK_FG49_P1 mit und ohne Dox ab.

Da keines der Experimente der ersten Runde erfolgreich war, war die Überlegung, dass die hyperaktive Variante der Thymidinkinase das Substrat GCV möglicherweise zu schnell umsetzt. Unterschiede im Proteinlevel würden sich dadurch nicht auf Zellviabilitätsebene abzeichnen. Aus diesem Grund wurde das Experiment mit dem Substrat ACV wiederholt. ACV wird von der Tk39 um den Faktor 6,5 schlechter verwertet¹²⁷. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.38 unten zu finden. Die Verwendung von ACV zeigte sowohl bei den Konstrukten mit chimären Intron als auch bei den Konstrukten mit dem β -Globin Intron 2 leichte Effekte, wobei diese bei letztgenanntem Intron noch deutlicher ausfielen. Die Regulationsfaktoren lagen mit ca. 1,5-fach aber unter den Erwartungen.

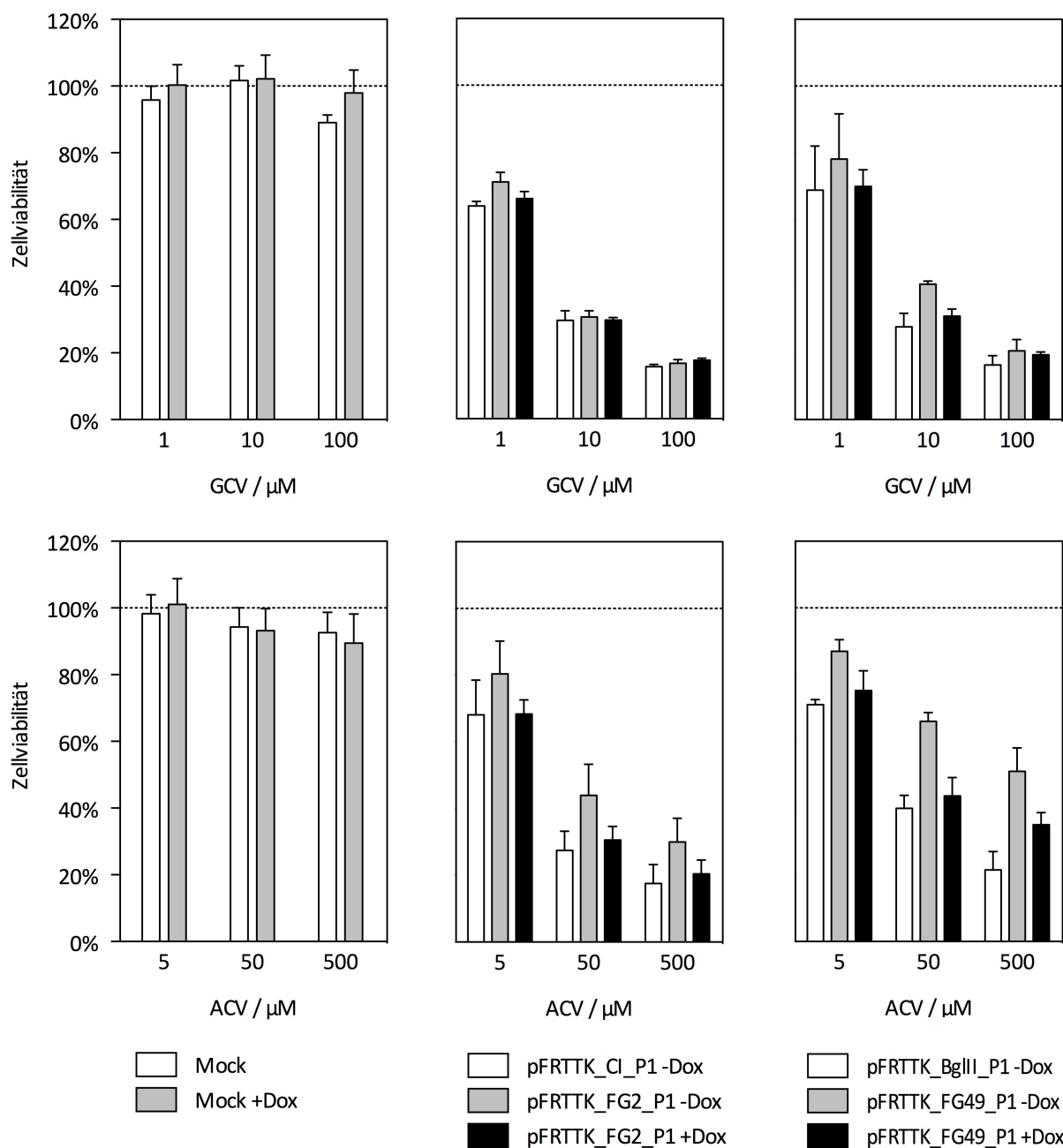


Abbildung 3.38 Dox-abhängige Zellviabilität in Anwesenheit von GCV und ACV.

Die angegebenen Konstrukte wurden in Hek-293-Zellen transfiziert und in An- und Abwesenheit von 50 μ M Dox einem Gradienten von GCV (oben) und ACV (unten) ausgesetzt. Die bestimmte Zellviabilität wurde nach Abzug des Hintergrundes (nur Medium) auf die jeweiligen Konstrukte ohne GCV bzw. ACV normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.20 Verbesserte Apoptoseinduktion durch die destabilisierte Variante der TK39

Die Ergebnisse des Viabilitätsassay für die pFRTTK-Konstrukte zeigte nicht den deutlichen Effekt, der basierend auf den Reporteranalysen und der qRT-PCR-Analysen erwartet wurde. Durch die Verwendung von ACV anstelle von GCV konnte der geringe Effekt, der sich abzeichnete, verstärkt werden. Es schien, dass nicht nur die hyperaktive Variante der Thymidinkinase für das Ergebnis verantwortlich war, sondern wohl auch die Akkumulation der Tk über den Versuchszeitraum von 3 bzw. 4 Tagen. Damit, wie im Luziferase-basierten System, sich Ereignisse auf RNA-Ebene schneller/direkter auf Proteinebene und dann schließlich auf Zellviabilitätsebene niederschlagen, wurde bei allen Konstrukten eine Destabilisierungssequenz (PEST-Tag, gleicher wie in pDLP) angefügt. Mit diesen Konstrukten wurde das Experiment wiederholt. Die Inkubationszeit wurde von vier Tagen auf fünf Tage erhöht, da die Proteinmenge durch den PEST-Tag reduziert war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.39 zu finden.

Das maximale Schaltverhalten des Riboregulators mit CI liegt unter Verwendung von 1 μM GCV bei 1,7-fach und unter Verwendung von 500 μM ACV bei 1,4-fach. Das Konstrukt mit BgIII-Intron erreicht unter Verwendung von 10 μM GCV einen Schaltfaktor von 3,5-fach, während bei 500 μM ACV das Maximum bei 1,6-fach liegt.

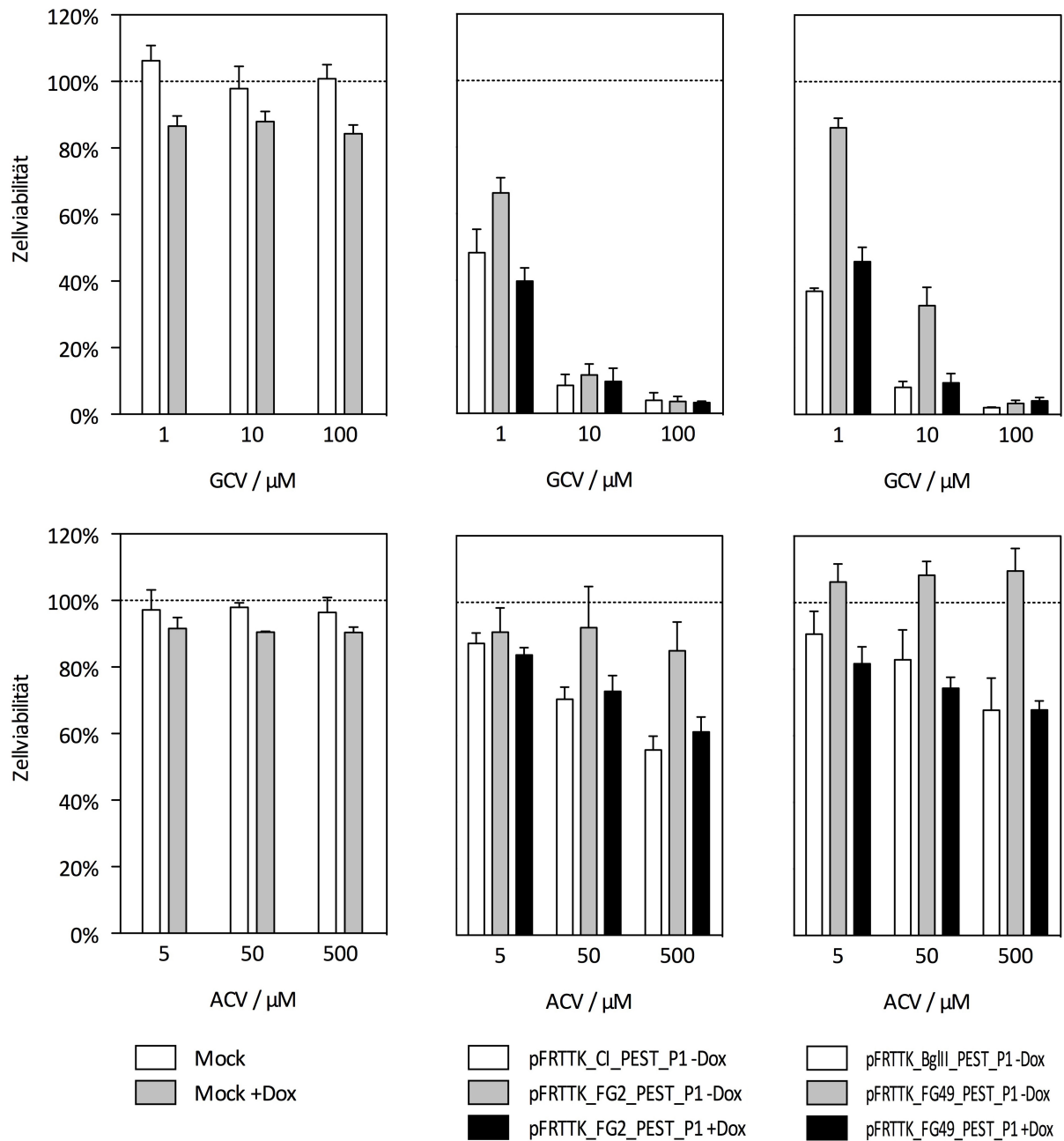


Abbildung 3.39 Einfluss der Destabilisierungssequenz auf das Schaltverhalten.

Die angegebenen Konstrukte wurden in Hek-293-Zellen transfiziert und in An- und Abwesenheit von 50 μ M Dox einem Gradienten von GCV (oben) und ACV (unten) ausgesetzt und für fünf Tage inkubiert bis zum Viabilitätsassay. Die bestimmte Zellviabilität wurde nach Abzug des Hintergrundes (nur Medium) auf die jeweiligen Konstrukte ohne GCV bzw. ACV normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit prozentualer Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.21 Verwendung von rTetR

Die Verwendung von TetR ermöglichte es einen Dox-abhängigen AN-Schalter zu erzeugen. Aus dem Tet-On/Tet-Off-System ist eine TetR-Variante bekannt, welche ein umgekehrtes Verhalten wie TetR zeigt: revTetR (rTetR). Das Protein rTetR besitzt fünf Aminosäureaustausche, wobei drei davon im Proteinkern liegen, wo die Tetracyclinbindestelle und der Ort der Konformationsänderung ist⁸⁸. Unter Verwendung dieser Variante könnte es möglich sein die Regulation durch das TetR-Aptamer auch auf Spleißebene umzudrehen, sodass auf Dox-Gabe das System abgeschaltet wird. Hierfür wurden Hek-293-Zellen mit pFG2 und pCMV_rTetR transfiziert. Die rTetR-Variante besaß keine Kernlokalisationssequenz. Aus diesem Grund wurden Hek-293-Zellen als Referenz mit pFG2 und pCMV_TetR (auch ohne NLS) transfiziert. Die relativen Luziferase-Aktivitäten beider TetR-Varianten sind in Abbildung 3.40 zu sehen.

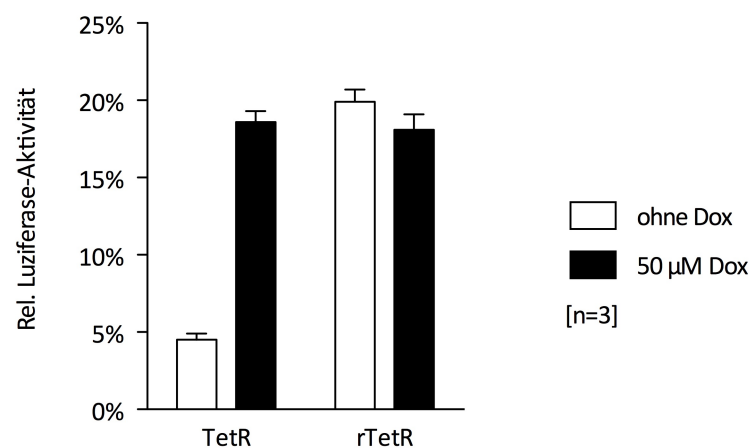


Abbildung 3.40 Schalteigenschaften von rTetR.

Hek-293-Zellen wurden mit TetR und rTetR, beide ohne NLS, transfiziert $\pm 50 \mu\text{M}$ Dox. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Luziferase-Aktivitäten mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Während die TetR-Variante ohne NLS einen Regulationsfaktor von 4,1-fach aufwies, zeigte rTetR keinen Einfluss auf die Luziferase-Aktivität. Beide Zustände waren auf dem gleichen Niveau wie das mit Dox-geschaltete TetR. Der AN-Zustand des Systems ist in beiden Fällen identisch. Der AUS-Zustand durch Transfektion mit pCMV_TetR zeigt hier einen höheren Wert als wenn pFG2 mit pCMV_NLS_TetR transfiziert wird. Daraus resultierend ein erniedrigter Schaltfaktor.

4 Diskussion

4.1 Selektion eines Ciprofloxacin-bindenden Aptamers

4.1.1 Ciprofloxacin als Zielmolekül der *in vitro*-Selektion

Im Allgemeinen müssen Zielmoleküle für *in vitro*-Selektionen viele Kriterien erfüllen, insbesondere dann, wenn aus ihnen im Weiteren ein Riboswitch generiert werden soll, der in höheren Eukaryoten eingesetzt werden kann. Die bisherigen, erfolgreich bei *in vitro*-Selektionen eingesetzten niedermolekularen Zielmoleküle besitzen meist eine oder mehrere der folgenden chemischen Eigenschaften^{69,139,140}:

- Die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen,
- planare, starre Ringsysteme, welche *stacking interactions* ermöglichen und/oder
- polarisierbare oder geladene Gruppen zur direkten Interaktion mit dem Phosphatrückgrad der RNA oder zur Ausbildung von Salzbrücken.

Um ein Aptamer anschließend für den Aufbau eines Riboswitches verwenden zu können, sollte das Zielmolekül weitere Bedingungen erfüllen¹⁴¹:

- Niedrige Zytotoxizität,
- gute Zellgängigkeit,
- hohe Löslichkeit und
- niedrige Produktionskosten.

Basierend auf diesen Kriterien und einer gewissen Ähnlichkeit zu bereits erfolgreich verwendeten Zielmolekülen, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind, wurde CFX ausgewählt.

Tabelle 4.1 Gegenüberstellung von CFX mit verschiedenen Zielmolekülen synthetischer Riboswitches.

	Ciprofloxacin	Tetracyclin	Theophyllin	Biotin	Malachitgrün	Neomycin B
M _w (g/mol) ^a	331	444	180	244	365	614
H-Donor ^a	2	6	1	3	1	13
H-Akzeptor ^a	5	9	3	3	2	15
Frei drehbare Gruppen ^a	3	2	0	5	3	9
Bioverfügbarkeit (%)	60-70	77-80	100	25-58 ^b	n.d.	n.d.
HWZ (h)	3-4	8-9	4-5	2 ^b	n.d.	2-3
Plasmaproteinbindung (%)	20-40	25-55	60	8 ^c	n.d.	78-88
K _D (nM)	-	0,8 ^d	100 ^e	5000 ^f	800 ^g	100 ^h

^a Daten entnommen aus ChemSpider-Datenbank¹⁴² (abgerufen am 02.02.2015) / ^b Entnommen aus¹⁴³ / ^c Entnommen aus¹⁴⁴ /

^d Entnommen aus⁷⁴ / ^e Entnommen aus²¹ / ^f Entnommen aus⁴³ / ^g Entnommen aus¹⁴⁵ / ^h Entnommen aus¹⁴⁶ / Alle weiteren Daten sind entnommen aus⁷⁹. N.d. = nicht bestimmt.

Die Beeinflussung der Zellviabilität und die Membrangängigkeit in den verwendeten HeLa-Zellen stimmen mit den bereits publizierten Daten überein^{78,147}. Es zeigte sich, dass nach 48 h Applikation die Zytotoxizität im Vergleich zu 24 h nur leicht

erhöht war und somit längere Inkubationen mit CFX möglich sind. Es konnte auch gezeigt werden, dass CFX in den gleichen Endkonzentrationen eingesetzt werden kann, die für die Schaltung von Riboswitchen mit Tc oder Neomycin benötigt werden (Kapitel 3.1.1) ^{42,65}.

Üblicherweise werden Fluorchinolone im Überstand lysierter Zellen mittels HPLC quantifiziert, um die Zellgängigkeit der Substanzen nachzuweisen ¹⁴⁸. Jedoch kann dies auch über die fluoreszenten Eigenschaften von CFX überprüft werden, da die Fluoreszenz nicht mit anderen Biomolekülen, wie z.B. Proteinen, überlagert. Außerdem ist die Fluoreszenzintensität von CFX so stark, dass subnanomolare Konzentrationen noch detektiert werden können (Abbildung 3.2). Die Zellgängigkeit von CFX wurde deshalb mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen. Es ergab sich im Prinzip eine freie Diffusion von CFX über die Zellmembran. Zwar ist der Fehler der gemachten Annahme (Fläche und Volumen von HeLa-Zellen) relativ groß (Summe der relativen Fehler ist 65% ¹⁰⁵), jedoch kann man davon ausgehen, dass CFX gut von HeLa-Zellen aufgenommen wird. Dies wurde bereits für andere Fluorchinolone beschrieben ^{79,148}. Die gute Zellpermeabilität von Fluorchinolonen ist sowohl dem Substituenten an Position 8 des Chinolon-Grundgerüsts, als auch dem sekundären/tertiären Stickstoff im Piperazinring geschuldet ⁷⁹. Sekundäre, bzw. tertiäre Stickstoffatome führen auch in anderen Medikamentengruppen, wie Schlafmitteln oder Lokalanästhetika, auf Grund ihres amphiphilen Charakters zu einer guten Diffusion über Zellmembranen ⁷⁹. In einer aktuellen Studie konnte für bronchiale Lungenepithelzellen gezeigt werden, dass CFX sogar aktiv in die Zelle aufgenommen werden kann ¹⁴⁹.

4.1.2 Auswahl des Selektionssystems

Anhand von CFX sollte im Labor eine Methode zur Selektion von Aptameren für niedermolekulare Substanzen etablieren werden. Die gewählte Selektionsmethode basierte auf Streptavidin-beschichteten, paramagnetischen *beads* und besaß den Vorteil, dass biotinylierte Zielmoleküle effizient immobilisiert werden können. Weiterhin kann die Dauer einer Selektionsrunde drastisch reduziert werden (von mehreren Tagen auf wenige Stunden). *Bead*-basierte Selektionsprotokolle wurden aus letztgenanntem Grund bereits erfolgreich für die Selektion von Aptameren angewandt ^{69,150-153}. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung dieses Systems und biotinylierter Moleküle besteht darin, dass nach Biotinylierung des niedermolekularen Zielmoleküls dieses mittels Massenspektrometrie und NMR überprüft werden kann und nicht wie bei der kovalenten Kopplung der Zielmoleküle direkt an die Matrix (z.B. an Sepharose) die Integrität der niedermolekularen Substanz unklar ist ^{38,43,146,151,152}. Zusätzlich erlaubt diese Methode nicht nur den Selektionsprozess für niedermolekulare Substanzen zu standardisieren, sondern auch durch parallele Selektionen gegen das gleiche Zielmolekül die bestmöglichen Selektionsbedingungen zu finden ¹⁵⁴.

Für eine *in vivo*-Applikation des Aptamers wären physiologische Pufferbedingungen von Vorteil. Die bereits etablierten Selektionsprotokolle verwenden phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) als Puffersystem. Dies wohl auch unter Berücksichtigung von Streptavidin im Selektionsansatz. Literaturdaten belegen aber, dass die Pufferbedingungen während der Selektion nicht zwangsläufig bestimmen ob ein Aptamer in der Zelle biologisch aktiv ist oder nicht. Aptamere gegen zum Beispiel Tc oder Neomycin, die eine breite Anwendung in zellulären Systemen fanden, wurden unter unphysiologischen Hochsalzbedingungen selektiert ^{38,146}. Gleiches gilt für die verwendeten Magnesiumkonzentrationen. Diese sind zwar oft unphysiologisch ¹⁵⁵ und es wurde bereits wenige Male gezeigt, dass Aptamere unter physiologischen Mg^{2+} -Konzentrationen selektiert werden können, doch wurde die Mehrzahl aller Selektionen mit Magnesiumkonzentrationen von 3 – 10 mM durchgeführt ¹⁵⁶.

4.1.3 Interpretation der Sequenzierungsergebnisse

Nach der Sequenzierung von angereicherten RNA-Pools ergibt sich oft ein ähnliches Bild der Häufigkeitsverteilungen. Die Sequenzen lassen sich in Familien mit großer Sequenzhomologie einteilen, wobei einzelne Sequenzen recht häufig im Pool vertreten sind, während vereinzelt sich Sequenzen finden lassen, die keiner Familie zugeordnet werden können (*orphans*) (Vgl. ^{38,146}).

Die Sequenzierung des in dieser Arbeit angereicherten Pools ergab größtenteils *orphans*, wobei sich über 60% ein gemeinsames Motiv teilten und Teile der vorhergesagten Sekundärstruktur identisch waren (Tabelle 3.1, Abbildung 3.9). Es konnten basierend auf den Sequenzhomologien keine Familien definiert werden, jedoch war dies in Bezug auf die vorhergesagten Sekundärstrukturen möglich. Die meisten der vorhergesagte Sekundärstrukturen falteten sich in eine Stammschleife, dessen Stamm durch ein ausgebulgtes Guanin unterbrochen ist (Abbildung 3.9, Abbildung 4.1). Das gefundene Motiv GCAGGA sitzt im terminalen Loop. Abgesehen vom ausgebulgtem G und einem U-G Basenpaar ist die Sequenz des Stammes variabel. Es ist anzunehmen, dass die Bindung des Zielmoleküls (immobilisiertes bioCFX) über die konservierten Basen innerhalb der Struktur stattfindet, wie man es auch aus phylogenetischen Analysen von natürlichen Riboswitchen kennt¹⁰. Vergleicht man die Vorhersage der Struktur mit den bekannten Strukturen des Theophyllin-, Neomycin- und Malachitgrün-Aptamers, so zeigt sich, dass die Bindung der Liganden über größere Ausbuchtungen (*bulges*) im Kernbereich des Aptamers stattfinden (Abbildung 4.1. B-D). Größere Ausbuchtungen sind in der Konsensus-Struktur (Abbildung 4.1 A) nicht zu finden. Auch die konservierten Nukleotide befinden sich größtenteils in der terminalen Schleife. Eine Bindung über terminale Schleifen ist eher charakteristisch für Protein-bindenden Aptamere/RNA-Moleküle^{157,158}.

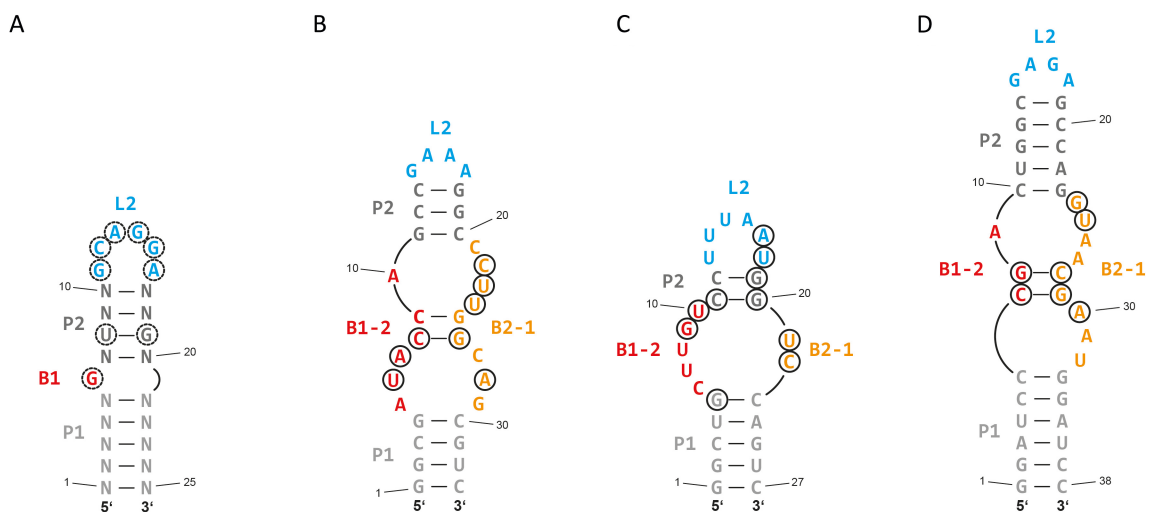


Abbildung 4.1 Gegenüberstellung der vorhergesagten Konsensus-Struktur mit RNA-Aptameren.

Dargestellt ist die vorhergesagte Konsensus-Struktur, die in über 60% der sequenzierten Klone im Pool der Runde 7 zu finden ist (A) sowie der Sekundärstrukturen des Theophyllin- (B), Neomycin- (C) und des Malachitgrün-Aptamers (D). Stämme (P), Ausbuchtungen (B) und Schleifen (L) sind in allen Darstellungen mit dem gleichen Farbcode versehen. Bei den Aptamerstrukturen in (B-D) sind die an der Bindung beteiligten Nukleotide eingekreist. In der vorhergesagten Struktur in (A) sind die konservierten Nukleotide gepunktet umrandet. Die Sekundärstrukturen in (B-D) sind entnommen aus⁷⁴⁻⁷⁶.

4.1.4 Diskrepanz in der Bestimmung der Bindekonstanten

Die Bindekonstanten von ausgewählten Sequenzen (CFX_K1, CFX_K2 und CFX_K18) wurden über drei unabhängige Methoden quantifiziert: Filterretention, isothermale Titrationskalorimetrie und Fluoreszenztitration. Während Klon 18 zwar in der ersten Charakterisierung Bindung an Streptavidin-beschichtete *beads* zeigte (Abbildung 3.10), konnte in der Filterretention keine Bindung fest gestellt werden (Abbildung 3.11). Dies war insofern interessant, da die Immobilisierung und der Ablauf der Filterretention identisch mit dem Selektionsprozess war. Somit ist der Nachweis einer ersten Bindung über Streptavidin-beschichtete *beads* kein Garant für einen guten Binder. Dies mag vor allem daran liegen, dass während der Selektion die Konzentrationen der beteiligten Partner (RNA und immobilisierter Ligand) unbekannt sind und meist nur eine Bindung, wenn sie denn spezifischer Natur ist, über einen großen Überschuss an Ligand stattfindet. Darüberhinaus begünstigt die verwendete Hitzeelution die Anreicherung solcher RNA-Spezies.

CFX_K1 und CFX_K2 zeigten in der Filterretention gute Bindeeigenschaften (Abbildung 3.11), jedoch in der ITC und der Fluoreszenztitration keine Bindung (Abbildung 3.12 und 3.13). Die beiden letztgenannten Methoden zeichnen sich dadurch aus, dass diese sowohl labelfrei sind und auch keine Immobilisierung einer der beiden Partner (RNA und Ligand) benötigen. Aus diesem Befund lässt sich schließen, dass das für die Immobilisierung verwendete Streptavidin-Biotin-System bei der Bindung beteiligt sein muss. Die Aptamere CFX_K1 und CFX_K2 erkennen wohl den Komplex aus bioCFX und Streptavidin. Die durchgeführten Negativselektionen (RNA-Pool auf Streptavidin-beschichteten *beads* alleine) brachten also nicht den gewünschten Effekt. Da die Bindung von RNA-Molekülen nicht exklusiv nur Zielmolekül bzw. nur Streptavidin binden, wäre es sinnvoller gewesen, anstelle der Negativselektionen eine *Counter*-Selektion mit einem anderem biotinyliertem Fluorchinolonderivat durchzuführen oder mit freiem CFX zu eluieren.

4.1.5 Visualisierung des bioCFX-Streptavidin-Komplex

Die Anfertigung einer Visualisierung des „bioCFX-Streptavidin“-Komplexes sollte eine Idee davon geben, warum die Selektion zu keinem Aptamer geführt hat, welches das freie CFX bindet. Die Visualisierung wurde unter Verwendung der Kristallstruktur von an Streptavidin gebundenem Biotin sowie der Struktur von CFX durchgeführt (PDB-Einträge 1STP bzw. CPF). Als Vorlage zur Platzierung von CFX in die Struktur von 1STP wurden Kristallstrukturen aus der RCSB-Proteindatenbank zu Hilfe genommen, die Streptavidin mit Biotin-Derivaten abbilden,,: 4BX7, 1I9H und 1RXH. Die Visualisierung, die mit Hilfe der Software UCSF Chimera 1.8.1 erstellt wurde, ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Streptavidin besitzt eine Bindetasche für Biotin und bindet dieses mit einem K_D von 10^{-15} M¹⁵⁹. Biotin wechselwirkt nicht nur am Ringsystem mit Streptavidin, sondern auch mit dem Pentansäure-Rest. In allen Kristallstrukturen mit Biotin-Derivaten liegt Biotin, wie in Abbildung 4.2 A gezeigt, tief in der Bindetasche von Streptavidin. Das analog platzierte CFX-Molekül wird, ähnlich wie in Abbildung B-D gezeigt, aus dem Streptavidin-Molekül herausragen. Es ist schwer vorstellbar, dass mit dieser Art der Immobilisierung Aptamere gefunden werden können, die sich wie z.B. das Tc- oder das Malachitgrün-Aptamer um den Liganden legen und ihn einschließen^{74,145}. Die Zugänglichkeit verschlechtert sich nochmals durch das Vorhandensein der drei weiteren Streptavidin-Moleküle im Streptavidin-Tetramer.

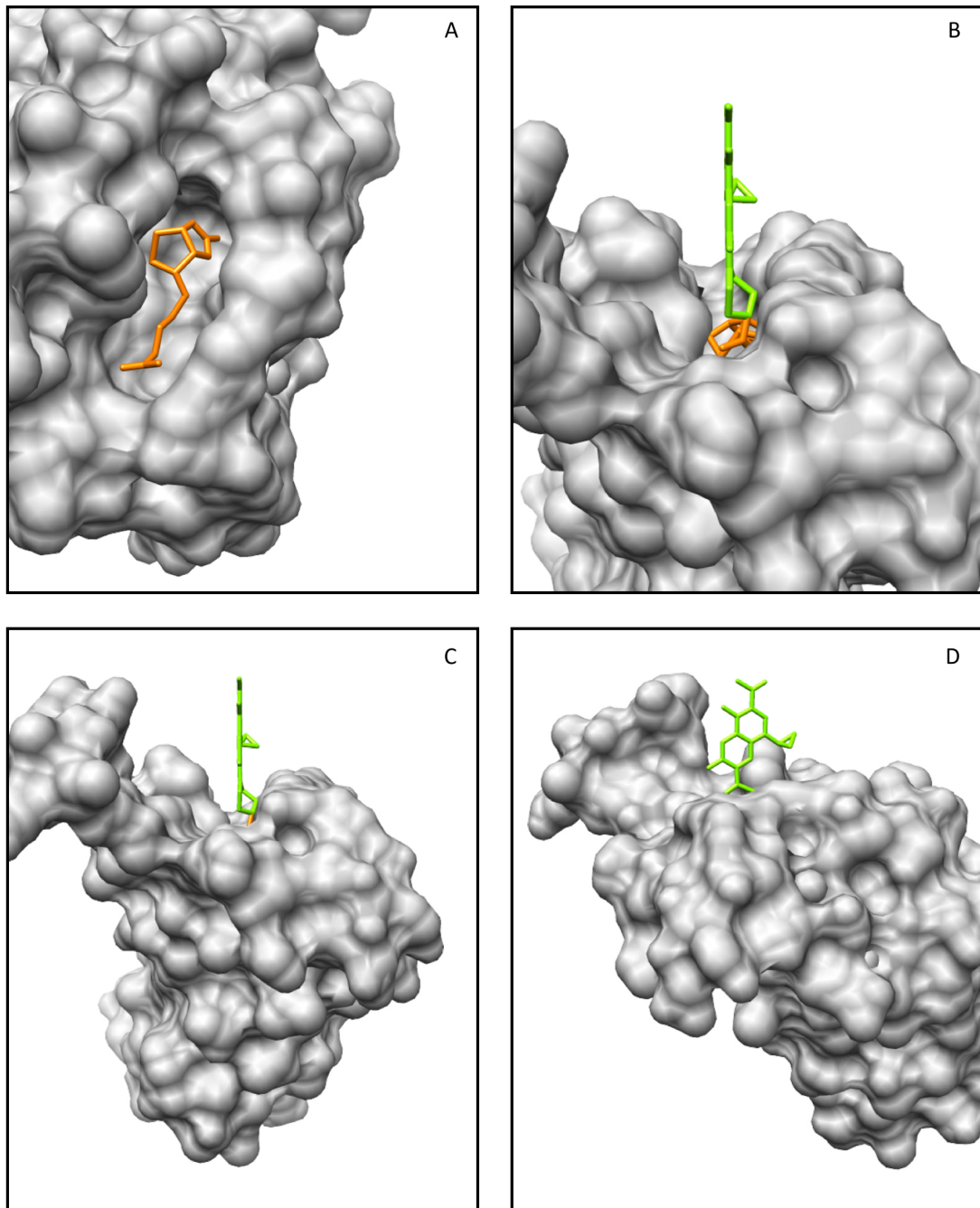


Abbildung 4.2 Visualisierung des bioCFX-Streptavidin-Komplex.

A. Darstellung der Bindetasche von Streptavidin (grau) mit gebundenem Biotin (orange). Gezeigt ist nur das Streptavidin-Monomer (Kristallstruktur aus PDB: 1STP). **B – D.** Verschiedene Ansichten der Visualisierung von bioCFX (grün) an Streptavidin. Auch hier ist nur das Monomer gezeigt. Die gezeigten Visualisierung wurden mit Hilfe der Software UCSF Chimera 1.8.1 erstellt.

Die selektierten Aptamere, die, wie durch die Visualisierung deutlich gemacht, wohl die gemeinsame Oberfläche des bioCFX-Streptavidin-Komplex binden, besitzen Bindekonstanten in der Größenordnung, die im Mittel für RNA-Aptamer erwartet werden können⁶⁹. Auf Basis dessen kann die Aussage getroffen werden, dass die Selektion im Hinblick auf die Anreicherung bindender RNA-Moleküle gegen das immobilisierte Zielmolekül erfolgreich war. Die Methodik kann somit als etabliert angesehen werden, ist jedoch für Selektionen von Aptameren, die niedermolekulare Liganden binden, nicht geeignet.

4.1.6 Ausblick

Das auf Streptavidin-beschichteten, paramagnetischen *beads* basierende System wurde von einem Selektions-Experten empfohlen und zeigte bislang bei Proteinselektionen gute Ergebnisse^{160,161}. Trotz der bereits erwähnten Vorteile des Systems und des guten Selektionsverlaufes konnten keine Aptamere selektiert werden, die spezifisch das freie CFX binden. Basierend auf der Visualisierung würde man für weitere Selektionen mit diesem System vorschlagen, zwischen Biotin und CFX bzw. dem Zielmolekül im Allgemeinen, einen Linker einzusetzen, um den Abstand zu Streptavidin zu erhöhen. Für diese Synthesen sind bereits Biotin-Derivate mit Polyethylenglycol-Linker (PEG₂ bis PEG₁₈, ThermoFisher) erhältlich. Jedoch ist die Verwendung eines Linkers kein Garant dafür, dass sich das Zielmolekül nicht doch über schwache Wechselwirkungen auf Streptavidin zurückfaltet und ein gemeinsames Bindeepitop bildet. Darüber hinaus ist im Vergleich zu niedermolekularen Substanzen Streptavidin wesentlich größer und bietet somit auch wesentlich mehr Epitope an, die die Bindung an Streptavidin begünstigen und somit zu Aptameren führen, die den Komplex oder gar Streptavidin allein erkennen (persönliche Kommunikation mit Dr. Karl v. Laer). Aus diesem Grund sollte man eher ein Selektionssystem benutzen, welches nicht auf Streptavidin basiert und eine uniformere Matrix verwendet, wie Sepharose oder Polyacrylamid.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde im Labor die Selektionsstrategie geändert und unter meiner Anleitung ein CFX-Aptamer selektiert, das eine Dissoziationskonstante von 40 nM besaß. Die Immobilisierung erfolgte über Epoxy-aktiviertes PAA, wobei der Nachweis der Qualität und Quantität von CFX an der Matrix über dessen fluoreszente Eigenschaft gemacht wurde. Im verwendeten Puffersystem wurde Na⁺ gegen K⁺ ausgetauscht, was den Bedingungen im Cytoplasma entspricht. Nach 10 Runden Säulenchromatographie-basierter Selektion konnte ein angereicherter Pool an RNA-Molekülen erhalten werden. Die Bindung der einzelnen Aptamer konnte über Fluoreszenztitration nachgewiesen werden.

4.2 Konstruktion eines Riboregulators zur Kontrolle der Intronretention

4.2.1 Regeln zur Anwendung des Riboregulators

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde über ein TetR-bindendes Aptamer die Intronretention eines kleinen chimären Introns kontrolliert. Aus der systematischen Untersuchung ergaben sich folgende Regeln für die Anwendbarkeit:

1. TetR sollte eine N-terminale Kernlokalisationssequenz besitzen (Kapitel 3.2.3).
2. Die relative Menge an Reportergen-Plasmid zu TetR-Expressionsplasmid sollte, bei gleichem Promotor, 1:8 sein (Kapitel 3.2.11).
3. Die Spleißstelle, in die das chimäre Intron gesetzt werden sollte, sollte der in pFG2 ähnlich sein (AAGGGC / Intron / CCAGCG) (Kapitel 3.2.7 und 3.2.15).
4. Das TetR-Aptamer sollte für einen AN-Schalter 6 bzw. 7 nt nach der 5'SS inseriert werden (Kapitel 3.2.8).
5. Der Stamm des TetR-Aptamers sollte 9 – 11 bp lang sein mit ΔG -Werten zwischen -11,5 und -18,7 kcal/mol (Kapitel 3.2.9).
6. Für eine vollständige Induktion des Systems sollte die Doxycyclin-Konzentration über 5 μ M liegen (Kapitel 3.2.12).

In den folgenden Kapiteln werden die hier aufgelisteten Regeln erörtert und diskutiert, bzw. begründet.

4.2.2 Begründung des experimentellen Aufbaus

Die Kontrolle der Intronretention über das TetR-Aptamer wurde in einem dualen Reportergen-System etabliert. Bei diesem wurde eine Luziferase (*Renilla*) konstitutiv exprimiert, während die Expression der anderen Luziferase (Firefly) über das TetR-Aptamer reguliert werden sollte. Die konstitutiv exprimierte Luziferase wurde zur Normalisierung eingesetzt. Beide Luziferasen standen unter der Kontrolle eines dualen CMV-Promotors, was sowohl unspezifische, promotorabhängige Effekte ausschließen sowie eine Cotransfektion beider Luziferasen überflüssig machen sollte^{115,162}. Des Weiteren wurde die Halbwertszeit der Firefly-Luziferase durch eine Destabilisierungssequenz verkürzt, sodass das Expressionsniveau um den Faktor 10 sank (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Einklang mit den bereits publizierten Daten zu der Destabilisierungssequenz der Ornithin-Decarboxylase¹⁶³. Es sollte so gewährleistet werden, dass Änderungen auf RNA-Ebene direkt auf Proteinebene messbar sind. Dieser Ansatz konnte über den Vergleich von Luziferase-Daten mit RT-PCR- und qRT-PCR-Analysen verifiziert werden (siehe Kapitel 3.2.4).

Das regulierte Intron sollte über den Mechanismus der Intron- und nicht über Exon-Definition erkannt werden. Dadurch wird die Erkennung des Introns unabhängig von der relativen Position und Sequenzumgebung im Reportergen. Deshalb wurde ein Intron verwendet, welches kleiner als 250 bp ist (siehe Kapitel 2.8). Es handelt sich um ein weitläufig verwendetes chimäres Intron (nähere Beschreibung in Kapitel 3.2.1). Die Insertion des Introns erfolgte an verschiedenen Positionen innerhalb des Reportergens. Es konnte gezeigt werden, dass das Intron durchweg gut erkannt wurde. Die intronhaltigen Reportergene zeigen zum Ausgangskonstrukt (ohne Intron) vergleichbare Luziferase-Aktivitäten (Tabelle 6.6). Eine translationsfördernde Wirkung, wie sie in der Literatur beschrieben wird, konnte nicht beobachtet werden¹⁶⁴.

Die Bindung von TetR an das Aptamer findet im Zellkern statt. Damit hier die relative Menge von TetR erhöht ist, wurde TetR durch Anfügen einer Kernlokalisationssequenz optimiert. Hier zeigte sich, dass die N-terminal angebrachte NLS wesentlich wirksamer war als die C-terminale (Abbildung 3.16). Dies entsprach den Erwartungen, denn die meisten

klassischen, einteiligen Kernlokalisationssequenzen sind am N-Terminus zu finden. Die verwendete Kernlokalisationssequenz ist in ihrem Ursprungsgen auch am N-terminus lokalisiert^{120,165}. Die Zugänglichkeit der NLS wurde an beiden Enden durch Glycin-Serin-Linker gewährleistet. Basierend auf der Kristallstruktur von TetR (Abbildung 2.7) sollte dadurch weder die Erkennung der NLS noch dessen Dimerisierung oder Bindung an das Aptamer negativ beeinflusst werden. Die Funktionalität der verschiedenen TetR-Varianten wurde durch das Reporter-genkonstrukt pFG2 gezeigt (Tabelle 6.3). Die Regulationsfaktoren, die im Luziferase-Assay erhalten wurden, korrelierten mit den relativen Expressionen der TetR-Varianten im Zellkern.

Das auf TetR-basierende System kann durch drei Zustände definiert werden: Im ersten Zustand ist die Expression in Abwesenheit von TetR und Dox hoch, im zweiten Zustand ist die Expression nach Zugabe von TetR aber Abwesenheit von Dox niedrig und im dritten Zustand wird eine hohe Expression des Reportergens durch Anwesenheit von TetR und Dox erzielt (Abbildung 3.2.4). Die drei Zustände wurden unter Verwendung des Reporter-genkonstrukts pFG2 getestet. Es zeigte sich, dass die Luziferase-Aktivitäten in Zustand 1 und Zustand 3 identisch waren. Dieses Ergebnis war nicht zwangsläufig zu erwarten, da es trotz hoher Spezifität der DNA-Bindedomäne von TetR zur Beeinflussungen der Genexpression hätte kommen können. Das System ist durch die Messung von Zustand 2 und 3 somit ausreichend charakterisiert.

4.2.3 Einfluss des Aptamers auf die basale Expression

Durch Einbringen von stark gefalteten Strukturen (Aptameren) innerhalb von mRNAs wurde in den meisten beschriebenen Systemen, unter anderem auch durch Verwendung von synthetischen Riboswitchen, eine Erniedrigung der basalen Expression festgestellt^{42,45,166}. Analog zu diesen Beobachtungen konnte auch unter Verwendung des TetR-Aptamers innerhalb des chimären Introns ähnliche Effekte festgestellt werden (Abbildung 3.18 A, 3.20 und 3.23 A). Die basale Expression bei Konstrukten mit Regulationsfaktoren größer 2 wurden auf ca. 20% und darunter reduziert. Da die relative basale Expression gemessen wird an dem Konstrukt ohne TetR-Aptamer, sollte dies a) die Anwendbarkeit nicht beeinflussen, bzw. b) durch Verwendung eines stärkeren Promotors ausgeglichen werden können, falls die Expressionsstärke des regulierten Gens von Interesse ist.

4.2.4 Einfluss der Sequenzumgebung auf das Schaltverhalten

Der Einfluss der Sequenzumgebung auf die Aktivität des Riboregulators wurde systematisch durch Testung verschiedener Positionen innerhalb der Firefly-Luziferase untersucht. Hierbei wurde nicht nur die Sequenzumgebung variiert, sondern auch die relative Position des Riboregulators innerhalb des Reportergens. Die getesteten Positionen wurden anhand der relativen Positionen zum Startcodon bzw. in Abhängigkeit von dem bis dato am besten funktionierenden Konstrukt pFG2 ausgewählt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der relativen Position des Riboregulators innerhalb des Reportergens und den gemessenen Schaltfaktoren gefunden werden (Tabelle 3.2 und Abbildung 3.21). Auch zeigten die Positionen, die von pFG2 abgeleitet wurden, kein verbessertes Schaltverhalten. Hier ist jedoch zu erwähnen, dass die Sequenzähnlichkeit der 5'SS zu pFG2 nur 50% betrug. Möglicherweise ist eine noch größere Sequenzhomologie vor dem Intron notwendig (mehr als 3 Nukleotide Übereinstimmung). Das Spleißosom benötigt zwar nur 3 Nukleotide vom Exon, um das Intron an der 5'SS zu erkennen¹²², aber es scheint so, dass durch die Faltung des Aptamers weitere, stromaufwärts liegende Nukleotide notwendig sind (siehe Kapitel 4.26). Die Sequenz stromabwärts des Introns (3'SS) war nicht identisch

mit der Sequenz, die in pFG2 vorlag. Sowohl für die 5'SS als auch für die 3'SS entsprachen die exonischen Sequenzen selten der Konsensus-Sequenz, was aber die Spleißreaktion im weitesten Sinne nicht beeinflusste, da die Introns ohne Aptamer an jeder Position erkannt wurden (siehe Tabelle 6.6). Vollkommene Übereinstimmung der Sequenzen war auf Grund der Basenzusammensetzung des Reportergens nicht möglich. Eine klare Korrelation zwischen Stärke der 5'SS und des Regulationsfaktors konnte ebenso nicht fest gestellt werden (Daten nicht gezeigt). Es scheint, dass weitere Faktoren, die über die bloße Abfolge der Nukleotide hinaus gehen, verantwortlich sind für das Schaltverhalten der Konstrukte.

Stellt man den Regulationsfaktor gegen die relativen Luziferase-Aktivitäten dar, so ergibt sich ein hyperbolischer Zusammenhang wie aus Abbildung 4.3 ersichtlich wird. Dargestellt sind die Regulationsfaktoren ($\pm 50 \mu\text{M}$ Dox) gegen die relative Luziferase-Aktivitäten einmal ohne bzw. mit $50 \mu\text{M}$ Dox für die Konstrukte der verschiedenen Intronpositionen pFG2, pFG4 – pFG15. Diese besitzen alle den gleichen Riboregulator an unterschiedlicher Position innerhalb des *luc2*-Gens und sind somit vergleichbar.

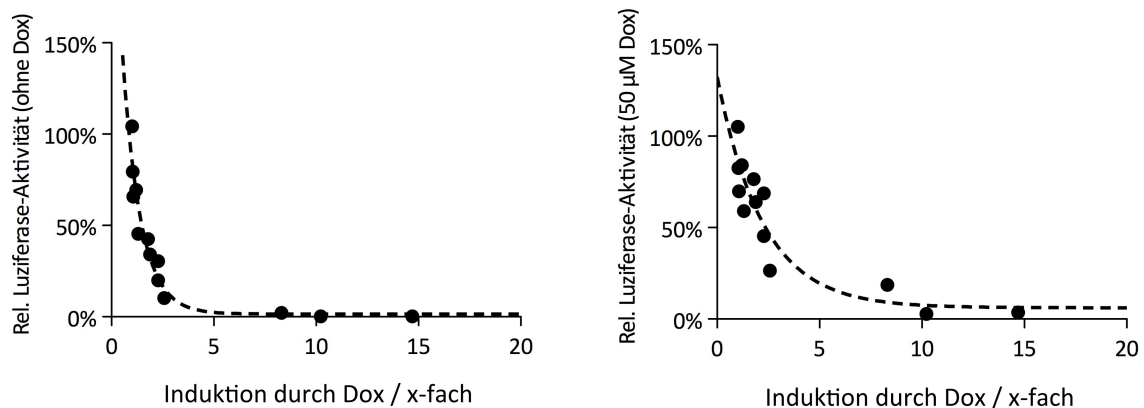


Abbildung 4.3 Zusammenhang zwischen Luziferase-Aktivität und Regulationsfaktor.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Regulationsfaktoren der Konstrukte pFG2, pFG4- pFG15 gegen die relativen Luziferase-Aktivitäten ohne bzw. mit $50 \mu\text{M}$ Dox.

Sowohl mit als auch ohne Dox sank bei steigendem Regulationsfaktor die relative Luziferase-Aktivität ab. Somit scheint der Regulationsfaktor an die basale Expression gekoppelt zu sein: Je niedriger diese, desto höher der Regulationsfaktor. Dieser Zusammenhang kann möglicherweise darin begründet liegen, dass bei niedrigen relativen Luziferase-Aktivitäten kleine absolute Änderungen große prozentuale Änderungen hervorrufen und so den Regulationsfaktor beeinflussen.

4.2.5 Einfluss der relativen Aptamerposition auf das Schaltverhalten

Bei fixierter Intronposition wurde die relative Position des TetR-Aptamers variiert. Beginnend von 2 Nukleotiden nach der 5'SS wurde das Aptamer sukzessive von der 5'SS weg gerückt. Hierbei zeigte sich, dass die Positionierung des Aptamers nahe der 5'SS (2-5 Nukleotide nach der 5'SS) nicht funktional waren. Konstrukt pFG19 (4 Nukleotide nach der 5'SS) zeigte nur Luziferase-Aktivität, weil die durch das Aptamer verdrängte Sequenz durch den Stamm des Aptamers wieder eingebracht wurde und somit die 5'SS wieder herstellte. Wurde hingegen das Aptamer 8 nt und weiter von der 5'SS inseriert, ging der Regulationsfaktor bei gleichzeitiger Wiederherstellung der 100%igen basalen Expression jedoch verloren (verglichen mit pDLP_CI). Dies entsprach den Erwartungen, da durch die größere Entfernung zur 5'SS die Regulation über den vorgeschlagenen Mechanismus der sterischen Hinderung des Spleißosoms nicht mehr möglich war und somit auch keine Beeinflussung der basalen Expression erwartet werden konnte. Die Positionen, bei denen der

Abstand zur 5'SS 6 bzw. 7 nt betrug, zeigen auf Dox-Applikation eine Erhöhung der Luziferase-Aktivität. Dagegen zeigte die Insertion 8 nt nach der 5'SS einen umgekehrten Phänotyp. Diese Herabregulation der Luziferase-Aktivität könnte strukturell begründet sein. Durch Ablösen von TetR-Dox vom Aptamer könnte es zu einer Umformung der 5'SS kommen und deren Zugänglichkeit wird wieder hergestellt (Abbildung 4.4). Erste Hinweise, dass sich die Konstrukte pFG2 und pFG22 in der Faltung der 5'SS unterscheiden, geben vorläufige *inline probing*-Experimente, die im Anhang in Abbildung 6.5 zu finden sind. An dieser Stelle ist anzumerken, dass beim Austausch des CI durch das β -Globin Intron 2 diese Effekte nicht mehr auftraten, was darauf hindeutet, dass die lokale Umgebung im CI einen entscheidenden Einfluss auf diesen Effekt hat.

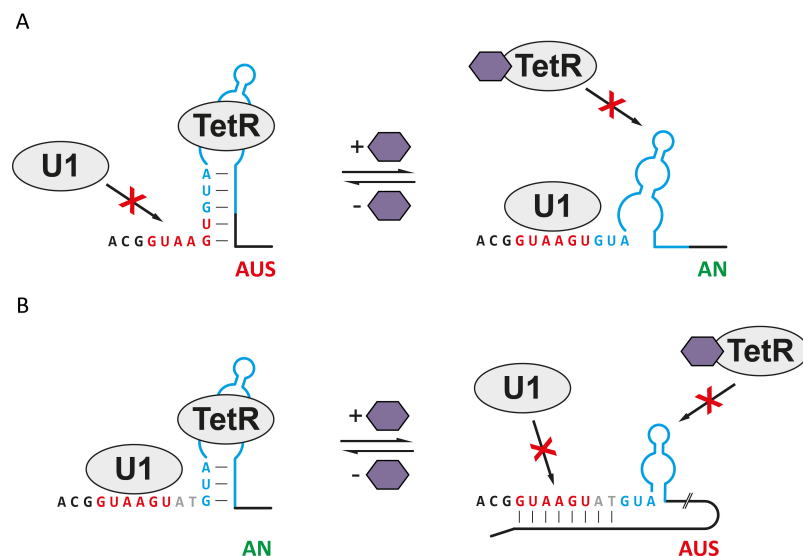


Abbildung 4.4 Hypothetischer Mechanismus des AN- bzw. AUS-Schalters.

A. Hypothetischer Mechanismus für das Reportergenkonstrukt pFG2: In Anwesenheit von TetR wird das Aptamer gebunden und die Zugänglichkeit des U1-snRNP ist blockiert. Nach Zugabe von Dox (violette Hexagone) fällt die sterische Hinderung von TetR weg und U1 kann die 5'SS binden. Das Intron wird herausgespleißt. **B.** Hypothetischer Mechanismus für das Reportergen pFG22: Durch Bindung von TetR an das weiter hinten gelegene Aptamer wird der Bereich um die 5'SS strukturiert, sodass diese frei zugänglich ist und erkannt werden kann. Das Intron wird herausgespleißt. Durch Zugabe von Dox löst sich TetR vom Aptamer und durch Umstrukturierung im Bereich der 5'SS wird diese sequestriert. Die 5'SS kann nicht erkannt werden und das Intron verbleibt in der mRNA.

Der in Abbildung 3.23 C gezeigte enge Bereich der möglichen Aptamerpositionen, bei denen regulatorische Aktivität gemessen werden kann, wurde auch schon von Gaur und Mitarbeiter in ihren Arbeiten mit dem Theophyllin-Aptamer an der 3'SS festgestellt⁶². Abhängig von der relativen Position des Aptamers konnten unterschiedliche Spleißaktivitäten *in vitro* festgestellt werden. Dass relative Aptamerpositionen eine entscheidende Rolle bei der Regulation spielen, konnte auch in bakteriellen Systemen mit dem Theophyllin-Aptamer in der Nähe der SD gezeigt werden¹⁶⁷.

4.2.6 Stammstabilität und Zugänglichkeit der 5'SS

Der Einfluss der Stammstabilität und der Stammlänge des TetR-Aptamers wurde durch drei verschiedene Ansätze untersucht. Bei allen Ansätzen wurden Teile des Introns, welche direkt auf das Aptamer folgen, so mutiert, dass diese keine Basenpaarungen mehr mit der 5'SS eingehen konnten (im Ausgangskonstrukt pFG2 waren schwache

Wechselwirkungen zwischen der 5'SS und der hinter dem Aptamer liegenden Sequenz möglich). In Ansatz 1 wurde die hinter dem Aptamer liegende Sequenz so verändert, dass diese sukzessive mit der 5'SS paaren konnte. Die erhöhte Stabilität führte erst ab einem ΔG -Wert von unter -22,2 kcal/mol auf Grund reduzierter Expression der Luziferase in Anwesenheit von Dox zu einer Reduktion des Regulationsfaktors. Bei den stabileren Stämmen ist eine Bindung von TetR nicht notwendig, um dem U1-snRNP die Zugänglichkeit zur 5'SS zu blockieren. Dies geschieht über den stabileren Stamm und die in den Stamm integrierte 5'SS. In *S. cerevisiae* jedoch brachte die Integration der 5'SS in den Stamm des Tc-Aptamers keine Veränderung der basalen Expression im Liganden-ungebundenen Zustand mit sich⁶⁴, was im Gegensatz zu den in dieser Studie erhaltenen Daten steht. In *in vitro*- und *in vivo*-Studien in HeLa-Zellen konnten Kim *et al.* aber mit dem Theophyllin-Aptamer den Verzweigungspunkt (*branch point*) eines Introns und deren Nutzung regulierte und eine Verlängerung des Stammes führte hier zu einer Inhibition der Spleißreaktion um den Faktor 3⁶³. Dies deutet darauf hin, dass sich hier wieder Unterschiede zwischen Hefe und höheren Eukaryoten abzeichnen, was die Verbindung zwischen Zugänglichkeit bestimmter Sequenzen und deren biologische Aktivität betreffen.

In Ansatz 2 wurde von pFG27 ausgehend der Stamm des Aptamers verkürzt. In Ansatz 3 wurde der Stamm des Aptamers durch Einführen von GU-Basenpaaren destabilisiert. Dies führte in beiden Fällen zu ΔG -Werten von über -10 kcal/mol und darüber. Die geringere Stammstabilität führte dazu, dass die Ausbildung des Aptamers und die Bindung von TetR verhindert wurde, was zu einer verbesserten Erkennung der 5'SS durch das U1-snRNP führen könnte.

Interessanterweise führte die Mutation der Sequenz hinter dem Aptamer, wie sie in pFG2 zu finden ist, bei pFG27, welches den selben Aptamerstamm besitzt, zu einem reduzierten Schalfaktor (8- auf 6-fach). Betrachtet man die Zugänglichkeit der 5'SS in diesen drei Ansätzen und in den Konstrukten mit variiertem Intron-Position, so kann man in den vorhergesagten Sekundärstrukturen erkennen, dass gut regulierte Konstrukte eine 5'SS ausweisen, bei der 2-4 nt einzelsträngig vorliegen, während bei schlecht regulierten Konstrukten (Regulationsfaktor unter 2) die 5'SS maskiert ist (Abbildung 4.5). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass im Fall der gut regulierten Konstrukte eine Konkurrenz zwischen TetR und U1-snRNP stattfindet, welche durch Dox-Applikation aufgelöst wird. Ausnahme zu dieser Beobachtung macht Konstrukt pFG5, welches nicht reguliert ist, aber eine teilweise einzelsträngige 5'SS aufweist, wie pFG2.

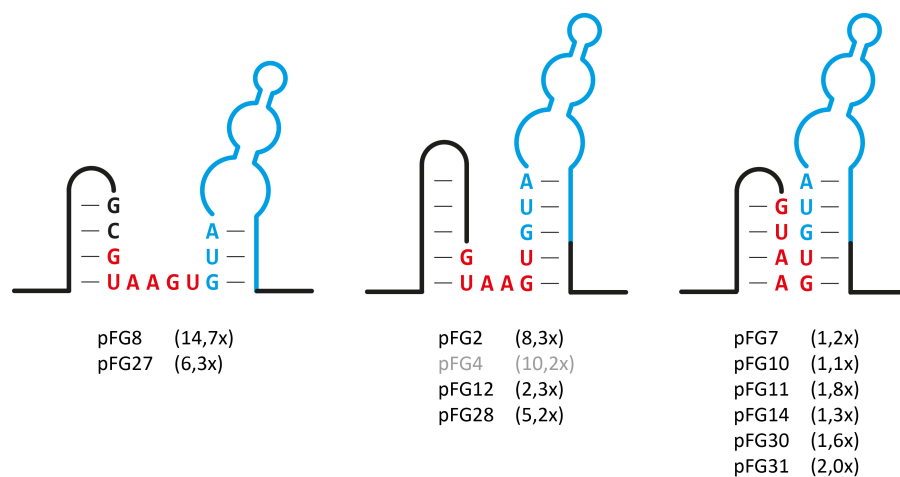


Abbildung 4.5 Übersicht über die Zugänglichkeiten der 5'SS in pFG2 und weiteren Konstrukten.

Dargestellt sind die vorhergesagten Sekundärstrukturen der 5'SS, wie sie sich im natürlichen Kontext ergeben. Die umliegenden Sequenzen sind in schwarz dargestellt, die 5'SS in rot und das TetR-Aptamer in blau. Die Vorhersagen der Sekundärstruktur wurden auf Basis des Zuker-Algorithmus erstellt¹⁰⁷. Hierfür wurden die Sequenzen 50 nt stromauf- und stromabwärts des Aptamers verwendet. Dargestellt ist nur der Ausschnitt, der die 5'SS betrifft. Zu den dargestellten 5'SSs ist jeweils das zugehörige Reportergenkonstrukt und der Regulationsfaktor aufgelistet. Die Sequenzen und die Struktur ist in einigen Konstrukten identisch und wurde zusammengefasst. Bei pFG4 ist die Sequenz vor der 5'SS AGT und ist deswegen in grauer Schrift dargestellt. Die Basenpaarungen bei pFG4 sind wie angegeben.

Dieser Befund legt nahe, dass Stammstabilität, Zugänglichkeit der 5'SS und Konkurrenz zwischen Bestandteilen des Spleißosoms (U1-snRNP) mit dem TetR-Aptamer-Komplex in Verbindung stehen. Die ideale Balance zwischen diesen Faktoren ist wohl in pFG2 realisiert, da hier der höchste Schalfaktor in Kombination mit guter basaler Expression zu beobachten war. Die Beobachtung, dass die Zugänglichkeit von Spleißstellen direkt mit der biologischen Funktion korreliert, wurde auch von der Gruppe um Rajesh Gaur gemacht⁶². Hier wurde das Theophyllin-Aptamer an die 3'SS gesetzt und die Zugänglichkeit dieser in einem *in vitro*-Spleißassay kontrolliert.

4.2.7 Einfluss der TetR-Menge und der Doxycyclin-Konzentration

Der dem System zu Grunde liegende (vorgeschlagene) Mechanismus beruht auf sterischer Hinderung der 5'SS durch den TetR-Aptamer-Komplex. Somit sollte es zur Konkurrenzsituation zwischen TetR und dem U1-snRNP kommen. Die Bindekonstante von TetR*Aptamer ist 16 nM, die Bindekonstante des U1-snRNP*5'SS liegt zwischen 0,3 und 14 nM^{91,168}. Somit liegen beide Bindekonstanten im gleichen Bereich und können miteinander in Konkurrenz treten. Daraus kann gefolgert werden, dass eine Erhöhung der Menge an TetR relativ zum Reportergen eine Verbesserung des Schalfaktors bewirken kann. Natürlich ist auch einfach eine Erhöhung der Ligandenkonzentration in der Zelle oftmals für eine Verbesserung des Schalfaktors bei synthetischen Riboswitchen bzw. Riboregulator beobachtet worden^{22,26,30,41,57}. Um diese Hypothese zu testen, wurden steigende Mengen TetR-Expressionsplasmid bei konstanter Menge Reportergenplasmid pFG2 in Hek-293-Zellen transfiziert (Abbildung 3.29). Mit zunehmendem Verhältnis von TetR-Expressionsplasmid zu pFG2 konnte der Regulationsfaktor bis auf 12,6-fach gesteigert werden. Grund hierfür war die reduzierte relative Luziferase-Aktivität ohne Dox, das heißt im Aptamer-gebundenen Zustand. Die relativen Luziferase-Aktivitäten in Anwesenheit von Dox blieben wie erwartet konstant.

Durch Applikation unterschiedlicher Konzentrationen von Dox konnte das System graduell angeschaltet werden. Die mittlere effektive Konzentration wurde auf 75,5 nM berechnet und die maximale Aktivität konnte bei 5 µM erreicht werden, was identisch ist mit den benötigten Konzentrationen im TetOn/Off-System^{86,169}. Im Gegensatz zu translationalen Schaltern, wie z.B. den Theophyllin-Switchen A-F der Gallivan-Gruppe, bei denen millimolare Konzentrationen Ligand benötigt werden, stimmen in diesem System die Konzentrationsbereiche zwischen K_D des Aptamers mit den benötigten Konzentrationen zur Aktivierung des Riboregulators überein, da Dox mit TetR und nicht mit der RNA interagiert¹⁷⁰. Des Weiteren konnte aus der sigmoidalen Kurve ein Hill-Koeffizient von 1,1 berechnet werden, was die Stöchiometrie des Komplexes bestätigt, die bereits in früheren Untersuchungen bestimmt worden war (1:1, ein Aptamer bindet ein TetR Dimer)⁹¹.

4.2.8 Anwendung des Riboregulators in Apoptose induzierenden Genen

Die Anwendbarkeit des Riboregulators sollte mit den beiden Genen CD20 und HSV-TK39, mit denen sich die Apoptose induzieren lässt, getestet werden. Die Wahl dieser Gene wurde getroffen, da der Riboregulator zum einen als *kill switch* in der Gentherapie eingesetzt werden könnte. Zum anderen ist die Änderung der Zellviabilität über standardisierte Verfahren präzise messbar. Sowohl für CD20 als auch für TK39 wurde die Verwendung und Induktion der Apoptose über die jeweiligen Induktoren schon mehrfach gezeigt^{66,128,171,172}. Basierend auf den abgeleiteten Regeln aus der systematischen Untersuchung im Reportgensystem konnte in der CDS von CD20 eine und in der CDS von TK39 zwei ideale Positionen für die Integration des Riboregulators gefunden werden. Die Sequenz vor dem Riboregulator (5'SS) stimmt in

CD20 zu 100% mit der in pFG2 überein, in TK39 stimmen 3 bzw. 4 nt überein. In der 3'SS stimmen bei beiden Genen 2 nt überein. Dies erschien ausreichend, da sich die 3'SS von exonischer Seite her nur über zwei Nukleotide definiert¹²². Zusätzlich zum Riboregulator mit dem chimären Intron wurde analog dazu auch das β -Globin Intron 2 in die CDS von TK39 kloniert, da dieses unter allen weiteren getesteten Introns die höchste basale Expression und den besten Schaltfaktor zeigte (siehe Kapitel 3.2.13). Darüber hinaus reguliert das TetR-Aptamer in diesem Kontext nicht die Intronretention, sondern, wahrscheinlich auch über den Mechanismus der sterischen Hinderung, die Wahl der 5'SS.

Im Vorversuch zu den CD20-Konstrukten konnte wie erwartet gezeigt werden, dass die Insertion des Introns allein und auch die Applikation von Dox keine Änderung der Signalstärke von CD20 im Westernblot zeigte. Wie außerdem zu erwarten war, senkte die Insertion des Riboregulators die basale Expression ab. Die Expression von TetR führte in Kombination mit pFRTCD20_FG2 zu einem zusätzlich Signal knapp unter dem CD20-spezifischen Signal. Es ist denkbar, dass es durch Blockierung der 5'SS zur Wahl einer alternativen SS kommt, ähnlich wie es im β -Globin Intron schon beobachtet wurde. Jedoch ist dieser Phänotyp des Riboregulators eine Ausnahme und wurde in den bisherigen Experimenten nie beobachtet. Geht man davon aus, dass nur das Signal auf korrekter Höhe von CD20 funktionales Protein darstellt, so erhöht sich der Regulationsfaktor von 3- auf 6-fach.

Die Induktion der Apoptose wurde durch Behandlung der Zellen mit Rituximab induziert. Der Nachweis apoptotischer bzw. toter Zellen wurde durchflusszytometrisch mittels PI-Färbung festgestellt. Der Anteil apoptotischer Zellen konnte durch Überexpression von TetR reduziert werden. Die Applikation von Dox führte zum gleichen Anteil PI-positiver Zellen wie die Kontrolle (Intron ohne Aptamer). Da die Zellen für dieses Experiment (wie in allen Experimenten) transient transfiziert und während der Rituximab-Behandlung mit Hasenretikulozyten-Extrakt behandelt wurden, war der Hintergrund an PI positiven Zellen recht hoch (untransfizierten Hek-293-Zellen reagierten auf die Behandlung mit einer hohen Anzahl an PI-positiven Zellen). Auf Grund dessen, dass diese Ergebnisse am Ende dieser Studie generiert wurden, war es nicht möglich, diese zu reproduzieren. Dies wird aber in den kommenden Monaten erfolgen. Darüber hinaus wurden die Konstrukte im pFRT-Rückgrat kloniert und werden ebenfalls in den kommenden Monaten genomisch integriert. Die genomische Integration macht zum einen die Transfektion überflüssig und ermöglicht längere Inkubationszeiten. Die Verbesserung des Schaltverhaltens nach stabiler Integration wurde schon in einer anderen Studie mit Apoptose-induzierenden Genen gezeigt¹⁷³.

Die auf TK39-basierenden Konstrukte wurden in einem Vorversuch mittels qRT-PCR analysiert, da kein adäquater Antikörper für Westernblot zur Verfügung stand. Die Analyse mittels qRT-PCR ist zwar genauso aussagekräftig, mag vielleicht sogar sinnvoller erscheinen, da hier die Spleißregulation untersucht werden soll, doch ist es letzten Endes die Proteinmenge, die über den Induktor die Apoptose induziert. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Analysen zeigten, dass der Riboregulator sowohl an Position 1 als auch an Position 2 funktional ist. Unter Verwendung des β -Globin Introns vergrößerte sich der Schaltfaktor an beiden Positionen (Abbildung 3.37).

Im Gegensatz zu dem CD20-System, in dem der Schaltfaktor auf Proteinebene mit der Induktion der Apoptose übereinstimmte, konnten die auf qRT-PCR basierenden Schaltfaktoren im TK39-System durch die Applikation von GCV nicht reproduziert werden. Unterschiede zwischen den Konstrukten \pm Dox konnten nicht festgestellt werden. Wahrscheinlich lag dies daran, dass die hyperaktive Variante der Thymidinkinase (TK39) das Substrat GCV zu schnell umsetzt und so Unterschiede in der Proteinmenge nicht mehr zum Tragen kommen. Die Wiederholung der Experimente mit dem schlechter zu verwertenden Substrat ACV zeigten, wie erwartet, in allen Experimenten höhere Zellviabilitäten verbunden mit einer Zunahme des Schaltfaktors. Dieser lag mit maximal 1,5-fach dennoch weit unter den Erwartungen.

Da die TK39 die Substrate wesentlich schneller umsetzt als der Wildtyp¹²⁷, wurde durch Rückmutation der Wildtyp wieder hergestellt. Dies führte allerdings zu keiner signifikanten Verbesserung des Schaltfaktors (Daten nicht gezeigt). Neben der Hyperaktivität, die wohl nicht für die beobachteten Ergebnisse verantwortlich war, könnte die 3- bis 4-tägige Inkubation im Zusammenhang mit der Stabilität der TK39 zum beobachteten Ergebnis führen. Um die Stabilität der Thymidinkinase zu reduzieren, wurde, wie schon im Reporter-gen-System, die Halbwertszeit durch Anfügen der Destabilisierungssequenz aus der Ornithin-Decarboxylase reduziert¹¹⁴. Die geringere Halbwertszeit und die damit verbundene geringere Proteinmenge wurde kompensiert durch eine längere Inkubation mit GCV bzw. ACV. Es konnte unter Verwendung von GCV eine signifikante Steigerung der Schaltfaktoren erreicht werden. Jedoch blieb der Riboregulator auch hier, mit einem maximalen Schaltfaktor von 1,7-fach weit hinter den Erwartungen zurück. Das Konstrukt mit dem β -Globin Intron zeigte einen maximalen Schaltfaktor von 3,5-fach und ist wie in den qRT-PCR-Analysen etwas besser als der Riboregulator mit dem chimären Intron. Im Vergleich zu dem Spleißregulationssystem, das von Smolke und Mitarbeiter aufgebaut wurde und auf dem Aptamer für das Hüllprotein des Bakteriophagen MS2 basiert, konnten in der Anwendung mit der HSV-TK identische bzw. etwas bessere Regulationsfaktoren erreicht werden⁶⁶.

4.2.9 Anwendbarkeit des TetR-Aptamers in weiteren Introns

In den letzten Jahren rückte Intronretention immer mehr in den Fokus der Wissenschaft (Zunahme der Pubmed-Einträge der letzten 20 Jahre im Anhang in Abbildung 6.7). Intronretention ist nicht nur ein Mechanismus um RNAs über *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) zu degradieren, sondern spielt z.B. eine wichtige Rolle während der Entwicklung der Granulozyten¹²⁵. Aus den während der Granulopoese differentiell regulierten Introns wurden das ATF Intron 4, das EIF1 Intron 1 und das LBR Intron 9 ausgewählt. Eine konditionale Regulation dieser Introns könnte helfen, den Prozess der Granulopoese genauer zu verstehen. Während die Introns in den Konstrukten, die nur das Intron enthielten, sehr gut erkannt wurden und in der RT-PCR-Analyse ein klares Signal auf Höhe der gespleißten *luc2*-mRNA zeigten, wurde durch Insertion des Aptamers das Spleißmuster dahingehend verändert, dass kaum gespleißte *luc2*-mRNA vorlag und eine große Anzahl unerwarteter Signale zu detektieren war. Auf Grund genannter Ergebnisse kann das TetR-Aptamer nicht zur Regulation dieser Introns eingesetzt werden.

Zusätzlich zu diesen drei Introns wurde auch das β -Globin Intron 2, welches bereits gut charakterisiert wurde¹⁷⁴⁻¹⁷⁶, verwendet. Im Falle des β -Globin Intron 2 konnte neben dem Signal für die gespleißte *luc2*-mRNA nur ein weiteres, distinktes Signal in der RT-PCR-Analyse detektiert werden. Dieses wurde durch Sequenzierung näher untersucht. Wie bereits in Studien zuvor gezeigt wurde, enthält das β -Globin Intron 2 kryptische Spleißstellen^{177,178}. Durch Blockade der 5'SS, durch den TetR-Aptamer-Komplex, konnte eine dieser kryptischen Spleißstellen aktiviert und so die Wahl der Spleißstelle reguliert werden.

Die Entscheidung, den Riboregulator auf dem chimären Intron aufzubauen, lag zum einen in der Größe des Introns selbst (Intron-Definition) und zum anderen in der Abwesenheit alternativer Spleißstellen. Die Verwendung größerer Introns, welche über den Mechanismus der Exon-Definition erkannt werden und sowohl schwache als auch kryptische Spleißstellen enthalten können, führten im Falle der untersuchten Introns zu einem nicht vorhersagbaren Spleißmuster. Die Menge an gespleißter *luc2*-mRNA sowie die relativen Luziferase-Aktivitäten mit dem TetR-Aptamer lagen teilweise auf einem sehr niedrigen Niveau. Die Anwendung des TetR-Aptamers in größeren, wohl auch natürlicheren Introns, ist nicht zu empfehlen, da das Spleißmuster nicht vorhergesagt werden kann.

4.2.10 Die Verwendung von revTetR

Die Proteinvariante revTetR (rtTA-M2), die durch fünf Punktmutationen aus TetR abgeleitet wurde, zeigte zu diesem einen umgekehrten (reversen) Phänotyp bezogen auf die Bindung des Tet-Operators $tetO^{88}$. Die Variante rtTA-M2 zeigte im Tet-Off-System die besten regulatorischen Eigenschaften. Durch die Verwendung von revTetR könnte also auch der Phänotyp des Intronretention-Systems umgekehrt werden. Dies war jedoch nicht der Fall. Durch revTetR konnte keinerlei Regulation festgestellt werden. Es war keine Veränderung der relativen Luziferase-Aktivitäten feststellbar (Abbildung 3.40). Da diese revTetR-Variante nicht funktional war, könnte daran liegen, dass 2 Punktmutationen im DNA-Bindekopf von TetR liegen, die möglicherweise mit der Aptamerbindung interferiert. Studien, die durch Niles und Mitarbeiter durchgeführt wurden, zeigten unter Verwendung einer Vierfachmutante von revTetR (rtTA-S2), dass der reverse Phänotyp auf ein TetR-Aptamer-basiertes System anwendbar ist⁹². Die in dieser Studie verwendete Mutante besaß nicht die Mutation S12G, die im DNA-Bindekopf liegt. Somit ist anzunehmen, dass diese Position wichtig für die Aptamerbindung ist. Eine Wiederholung der Experimente mit der Vierfachmutanten (rtTA-S2) sollte somit auch in diesem System zu guten Ergebnissen führen.

4.2.11 Ausblick

Der aus dem TetR-Aptamer und dem CI konstruiertem Riboregulator zeigt nicht nur auf Reporterger-Ebene hervorragende Eigenschaften, sondern es ließen sich auch klare Regeln für dessen Verwendung ableiten, die nicht zuletzt auch Anwendung fanden in der Kontrolle von CD20 und der HSV-Tk39. Mit einem Regulationsfaktor von bis zu 12,6-fach sollte der Riboregulator Einzug in die synthetische Biologie finden und verwendet werden zum Aufbau von komplexen Schaltkreisen. Hierbei wäre denkbar, dass der Riboregulator über einen Feedback-Mechanismus die Genexpression von TetR selbst steuert und so z.B. eingesetzt werden kann um eine circadiane Uhr in höheren Eukaryoten zu verwirklichen. Darüber hinaus sollte sich das System, weil es Bestandteile wie Dox und TetR verwendet, ausgezeichnet in bereits bestehende Systeme einfügen lassen.

Die Interaktion von TetR und dem TetR-Aptamer könnte in Zukunft auch genutzt werden um regulatorische Domänen von am Spleißprozess beteiligter Proteine näher zu charakterisieren. Die Fusion von TetR an eben diese regulatorischen Domänen und die Interaktion mit dem TetR-Aptamer könnte diese Dox-abhängig an die SS rekrutieren. Damit wäre durch den Riboregulator nicht nur eine Kontrolle der Genexpression möglich, sondern auch das bessere Verständnis des ganzen Spleißapparats.

5 Material und Methoden

5.1 Material

Die in dieser Studie verwendeten Materialien sind nachfolgend aufgelistet. Alle Chemikalien wurden, wenn möglich, in p.a.-Qualität bestellt. In Tabelle 5.1 sind die verwendeten Chemikalien und Reagenzien zu finden, in Tabelle 5.2 die verwendeten Geräte und in Tabelle 5.3 die kommerziell erhältlichen Systeme. Die verwendeten Enzyme, Proteine und Größenstandards sind in Tabelle 5.4 gelistet, die verwendeten pro- und eukaryotischen Stämme in Tabelle 5.5. Die Puffer, Reaktionsansätze und Oligonukleotide sind in den Tabellen 5.6, 5.7 und 5.8 zu finden. Die verwendeten und in dieser Studie konstruierten Plasmide sind in den Tabellen 5.9 und 5.10 aufgelistet. Die Klonierung der konstruierten Plasmide folgt im Anschluss auf die Auflistung.

Die Oligonukleotide wurden bei SIGMA-Aldrich bestellt (entsalzt und lyophilisiert). Puffer und Medien wurden mit MQ-Wasser hergestellt und, falls notwendig, für 20 min bei 121°C / 2 bar autoklaviert. Hitzelabile Substanzen wurden durch Filtration keimfrei gemacht (Sterilfilter mit 0,22 µm Porengröße).

Tabelle 5.1 Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
[α - ³² P] UTP [3000 Ci/mmol]	Hartmann Analytics, Braunschweig
0,5% Trypsin-EDTA	Life Technologies, USA
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Aceton	Roth, Karlsruhe
Aciclovir	Sigma-Aldrich, USA
Acrylamid (Rotiphorese Gel 40)	Roth, Karlsruhe
Agar	Oxoid, Heidelberg
Agarose peqGold Universal	Peqlab, Erlangen
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Benzamidin Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Biotin-Fluorescein Konjugat (FITC-Biotin)	Thermo Fisher, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Butanol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Ciprofloxacin Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)	Peqlab, Erlangen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Life Technologies, USA
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Life Technologies, USA
Dynabeads M280 Streptavidin	Life Technologies, USA
ECL Prime Blocking Reagent	Amersham, USA

Essigsäure (NaAc)	Roth, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fetal Calf Serum (FCS)	Merck, Darmstadt
Formamid	Roth, Karlsruhe
Ganciclovir	Sigma-Aldrich, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefe-tRNA	Life Technologies, USA
Hefeextrakt	Oxoid, Heidelberg
Hygromycin	Invivogen, Frankreich
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, USA
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Life Technologies, USA
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Life Technologies, USA
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Opti-MEM	Life Technologies, USA
Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol, 25:24:1 (PCI)	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, USA
Polyacrylamid (Rotiphorese Gel 40, 19:1)	Roth, Karlsruhe
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich, USA
Roti Aqua Phenol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
SDS-Pellets	Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Spermidin	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix	Life Technologies, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (10x)	Life Technologies, USA
Trypton	Oxoid, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Zeocin	Invivogen, Frankreich

Tabelle 5.2 Geräte.

Gerät	Hersteller
Biofuge (Fresco17, Pico17, PrimoR)	Heraeus Christ, Osterode
Brutschrank	Heraeus Christ, Osterode
Bio-Dot Microfiltration Apparat	Biorad, München
S3 Cell Sorter	Biorad, München
Feinwaage	Acculab, USA
Fluorolog-3 Spectrofluorometer	Horiba Jobin Yvon
Geldokumentation mit UV Schirm (254 nm und 312 nm)	INTAS, Göttingen
Heizblock	VWR, Darmstadt
Infinite M200 Fluoreszenz Plattenleser	Tecan Trading AG, Schweiz
Inkubationsschüttler Multitron	Infors AG, Bottmingen
Liquid Scintillation Counter 1409	Wallac, Monza
Magnetrührer IKA RET basic	IKA, Staufen
Milli-Q Wasserentsalzung mit RNase Filter	Millipore, Frankreich
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab, Erlangen
NU-6 KL UV-Handlampe	Benda, Wiesloch
PAGE-Systeme	C.B.S. Scientific, Del Mar
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Phosphoimager Typhoon 9400	GE, Schweden
StepOnePlus Real-time PCR System	Life Technologies, USA
TC-10 Automated Cell Counter	Biorad, München
Thermocycler Peqstar Universal 96	peqLab, Erlangen
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 5.3 Kits und kommerziell erhältliche Systeme.

Kits und kommerzielle Systeme	Hersteller
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega, USA
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher, USA
MaxTract High Density (1,5 und 2,0 ml Reaktionsgefäße)	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
ECL Plus western blotting detection reagents	GE Healthcare, England
GlycoBlue	Invitrogen, USA
Trizol	Life Technologies, USA
Mini-Protean TGX Precast Gel 8-16%	BioRad, München
TransBlot TurboTransfer Pack Mini 0,2 µm PVDF	BioRad, München
Quick Blunting Kit	New England Biolabs, USA
GeneAmp RNA PCR Kit	Applied Biosystems, USA

Tabelle 5.4 Enzyme, Proteine und Größenstandards.

Enzyme / Proteine	Hersteller
Polymerasen	
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase [2 U/μl]	New England Biolabs, USA
SuperScript II Reverse Transcriptase [200 U/μl]	Life Technologies, USA
MuLV Reverse Transkriptase [50 U/μl]	Applied Biosystems, USA
Taq DNA-Polymerase [5 U/μl]	New England Biolabs, USA
T7 RNA-Polymerase	Dr. K. von Laer (Goethe-Universität, Frankfurt)
Restriktionsendonukleasen	
EcoRI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
XbaI [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
Agel-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
NcoI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
SgrAI [10 U/μl]	New England Biolabs, USA
MluI [10 U/μl]	New England Biolabs, USA
BsiWI [10 U/μl]	New England Biolabs, USA
KasI [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
BamHI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
BsrGI [10 U/μl]	New England Biolabs, USA
EcoRV-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
BbsI [10 U/μl]	New England Biolabs, USA
NotI-HF [20 U/μl]	New England Biolabs, USA
BssHII [5 U/μl]	New England Biolabs, USA
SanDI [1 U/μl]	Fermentas, USA
Diverse Enzyme und Proteine	
Antarctic Phosphatase [5 U/μl]	New England Biolabs, USA
RiboLock RNase Inhibitor [40 U/μl]	Fermentas, USA
T4 DNA Ligase [400 U/μl]	New England Biolabs, USA
T4 Polynukleotidkinase [10 U/μl]	New England Biolabs, USA
TURBO DNase [2 U/μl]	Life Technologies, USA
Antikörper Hase Anti-TetR IgG	Dr. Chris Berens, FAU Erlangen
Antikörper Ziege Anti-Hase IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, USA
Antikörper Maus Anti-Actin IgG	Sigma-Aldrich, USA
Antikörper Hase Anti-Maus IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, USA
Antikörper Maus Anti-CD20 IgG / MS4A1	Thermo Fisher, USA
Antikörper Hase Anti-Hsp60 IgG	abcam, UK
Größenstandards	
peqGold Ultra Low Range DNA-Leiter II	PeqLab, Erlangen
pegGold 1 kB DNA-Leiter	PeqLab, Erlangen
Low range ssRNA ladder	New England Biolabs, USA
Precision Plus Protein All Blue Standards	BioRad, München

Tabelle 5.5 Pro- und eukaryotische Stämme.

Name	Genotyp / Anmerkung	Quelle
<i>E. coli</i> DH5α	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Sambrook, Molecular Cloning, 2001 ¹⁷⁹
<i>E. coli</i> DH10β	$\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>araD139 fhuA ΔlacX74 galk16 galE15 e14-φ80d/lacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	New England Biolabs
<i>E. coli</i> ET12567	F <i>dam13::Tn9 dcm6 hsdM hsdR zjj202::Tn10 recF143 galk2 galT22 ara14 lacY1 xyl5 leuB6 thi1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx78 mtI1 glnV44</i>	ATCC (BAA525)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i>	New England Biolabs
Hek-293-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen, etabliert durch Transformation mit Adenovirus Typ 5	DSMZ (ACC 305)
HeLa-Zellen	Humane Zervixkarzinom-Zellen	DSMZ (ACC 57)
A549-Zellen	Humane Lungenkarzinom-Zellen	DSMZ (ACC 107)

Tabelle 5.6 Puffer und Medien.

Puffer	Bestandteil	Konzentration
10x TBE	Tris	0,89 M
	Borsäure	0,89 M
	EDTA	10 mM
50x TAE	Tris	2 M
	Essigsäure	1 M
	EDTA	1 mM
	pH 8,3	
10x PBS	NaCl	1,37 M
	KCl	27 mM
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	81 mM
	KH ₂ PO ₄	17,6 mM
	pH 7,4	
6x DNA-Ladepuffer	Tris-Cl, pH 7,6	10 mM
	EDTA	60 mM
	Glycerin	60% (v/v)
	Bromphenolblau	0,03% (w/v)
	Xylencyanol	0,03% (w/v)
2x RNA-Ladepuffer	Formamid	
	EDTA	25 mM
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)
	Xylencyanol	0,1% (w/v)

Tabelle 5.6 Puffer und Medien. Fortsetzung

Puffer	Bestandteil	Konzentration
10x TBS(T)	Tris	200 mM
	NaCl	1,5 M
	pH 7,6	
	(Tween20	0,1 % (v/v))
10x Laufpuffer (Proteingel)	Tris	250 mM
	Glycin	1,9 M
	SDS	1% (w/v)
	pH 8,3	
4x Protein-Ladepuffer	2-Mercaptoethanol	15% (v/v)
	20% SDS-Lösung	20% (v/v)
	Bromphenolblau	0,1% (w/v)
	Glycerin	50% (v/v)
TE	Trypsin	0,05% (w/v)
	EDTA	0,022% (w/v)
	in 1x PBS (pH 7,4)	
Lyse-Puffer	Tris-Cl, pH 8,0	20 mM
	EDTA	2 mM
	NaCl	137 mM
	Glycerin	10% (v/v)
	IGEPAL CA-630	1% (v/v)
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC)	0,5% (v/v)
CE-Puffer (+IGEPAL CA-630)	HEPES pH 7,9	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	KCl	10 mM
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail	0,5% (v/v)
	(IGEPAL CA-630	0,2% (v/v))
NE-Puffer	HEPES pH 7,9	20 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	NaCl	420 mM
	EDTA	0,2 mM
	Glycerin	25% (v/v)
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail	0,5% (v/v)
10x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	Tris-Cl (pH 9)	10 mM
	KCl	50 mM
	Triton X-100	0,1% (v/v)
Selektionspuffer (Bindepuffer)	PBS (pH 7,4)	1x
	MgCl ₂	3 mM
Lagerungspuffer (SELEX)	PBS (pH 7,4)	1,25x
	BSA	10 mg/ml

Tabelle 5.7 Reaktionsansätze.

Reaktion	Bestandteil	Konzentration
<i>in vitro</i> -Transkription (SELEX)	Tris-Cl pH 8,0	200 mM
	DTT	5 mM
	NTP-Mix	2,5 mM
	MgCl ₂	15 mM
RT-PCR (SELEX)	PCR-Puffer ohne Mg ²⁺	1x
	5x <i>First strand buffer</i> (Invitrogen)	0,2x
	DTT	2 mM
	A50.47_fwd	1 µM
	A50.21_rev	1 µM
	MgCl ₂	1,5 mM
	dNTP-Mix	0,3 mM
Große Transkription	Tris-Cl pH 8,0	200 mM
	Magnesiumacetat	20 mM
	DTT	20 mM
	Spermidin	2 mM
	NTPs	je 4 mM
	Template	1 - 2 mg linearisierter Vektor
	T7-RNA-Polymerase	0,75 µg/ml
cDNA-Synthese	RNA	1 µg / 40 µl
	10x <i>PCR buffer II</i> (Invitrogen)	1x
	MgCl ₂	5 mM
	dNTPs	je 1 mM
	Random Hexamere (N ₆)	2,5 µM
	Ribolock	1 U/µl
	MuLV Reverse Transkriptase	0,8 U/µl
RT-PCR-Analyse	10x <i>ThermoPol buffer</i> (Neb)	1x
	dNTPs	200 µM
	fwd-Oligonukleotid	0,2 µM
	rev-Oligonukleotid	0,2 µM
	Template	5 µl cDNA
	<i>Taq</i> DNA-Polymerase	1,25 U/50 µl Reaktion

Tabelle 5.8 Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' → 3')
10_Apt_fwd	CAGCTAACGACATCTACAACGAGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
10_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGCTCGTTGTAGATGTCGTTAGCTG
10_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGCGAGCTGCTGAACAGCATG
10_Intron_fwd	CAGCTAACGACATCTACAACGAGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
10_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGCTCGTTGTAGATGTCGTTAGCTG
10_rev	CATGCTGTTTCAGCAGCTCGCCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTGG
11_Apt_fwd	CCTCTAGTCAGCTGACGCGTATGGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
11_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACCATACGCGTCAGCTGACTAGAGG
11_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGG
11_Intron_fwd	CCTCTAGTCAGCTGACGCGTATGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
11_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACCATACGCGTCAGCTGACTAGAGG
11_rev	CCCTTCTTAATGTTTTTGGCATCTTCCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTGG
12_1P_fwd	CAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGGGTCATCAC
12_1P_mut_b	GCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCAGAACAAGCTGCTTGATACACTTACGCCCTTC
12_1P_mut_f	CAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTGTATCAAGC
12_1P_mut_r	GGTCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACCTTGATGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
12_1P_rev	GGTCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACCTTGATGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTG
12_1R_fwd	AGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTCGCGTATCAAGCAGCATGTTATGGGTCAT CAC
12_1R_rev	GGTCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACCTTGATCGCGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCT TG
12_1X_fwd	AGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGGGCCGAAGG CCAG
12_1X_rev	ATTGGTCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACCTTGATGTATCAAGCTTTTCTCTGGCCTTCGGCCCATACATGCT
12_Apt_fwd	CACTCGAAGACGGGACCGCCGGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
12_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGCCGGCGGTCCCGTCTTCGAGTG
12_fwd	CACCTTGCCTTTCTCTCCACAGGAGCAGCTGCACAAAGCCATG
12_Intron_fwd	CACTCGAAGACGGGACCGCCGGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
12_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGCCGGCGGTCCCGTCTTCGAGTG
12_rev	CATGGCTTTGTGCAGCTGCTCCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTG
13_Apt_fwd	GCTACGCCCTGGTGCCCGGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
13_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGCCGGGCACCAGGGCGTAGC
13_fwd	CACCTTGCCTTTCTCTCCACAGACCATCGCCTTTACCGACG
13_Intron_fwd	GCTACGCCCTGGTGCCCGGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
13_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGCCGGGCACCAGGGCGTAGC
13_rev	CGTCGGTAAAGGCGATGGTCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTG
14_Apt_fwd	GCCCTGTTTCATCGGTGTGGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
14_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGCCACACCGATGAACAGGGC
14_fwd	CACCTTGCCTTTCTCTCCACAGTGTGGCCCCAGCTAACGAC
14_Intron_fwd	CCCTGTTTCATCGGTGTGGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
14_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGCCACACCGATGAACAGGG

14_rev	GTCTTAGCTGGGGCCACACTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTG
15_Apt_fwd	GTTTCATCGGTGTGGCTGTGGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
15_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGCCACAGCCACACCGATGAAC
15_fwd	CACCTTGCCTTTCTCTCCACAGCCCAGCTAACGACATCTACAACG
15_Intron_fwd	CTGTTTCATCGGTGTGGCTGTGGCGTAAGTGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
15_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGCCACAGCCACACCGATGAACAG
15_rev	CGTTGTAGATGTCGTTAGCTGGGCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTG
3_Apt_fwd	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACCGTTTGGCCACGGCCTCAC
3_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACCGTTTGGCCACGGCCTCAC
3_Intron_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCTTCCACCTACCAGGCATCCG
3_Intron_fwd	GTGAGGCCGTGGCCAAACGGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
3_rev	GTGAGGCCGTGGCCAAACGGTAAGTGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
3_rev	CGGATGCCTGGTAGGTGGAAGCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGG
4_Apt_fwd	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACCTGGTAGCCCTTGATTTGATCAGG
4_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACCTGGTAGCCCTTGATTTGATCAGG
4_Intron_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTAGCCCCAGCCGAACTGG
4_Intron_fwd	CCTGATCAAATACAAGGGCTACCAGGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
4_rev	CCTGATCAAATACAAGGGCTACCAGGTAAGTGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
4_rev	CCAGTTCGGCTGGGGCTACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGG
5_Apt_fwd	TGACGCGTATGGAAGATGCCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
5_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGGCATCTTCCATACGCGTCA
5_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGAAAAACATTAAGAAGGGGCCAGC
5_Intron_fwd	CTGACGCGTATGGAAGATGCCGTAAGTGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
5_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGGCATCTTCCATACGCGTCAG
5_rev	GCTGGGCCCTTCTTAATGTTTTCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGG
6_Apt_fwd	GAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
6_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACCCCTTCTTAATGTTTTTGGCATCTTC
6_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCCCAGCGCCATTCTACCC
6_Intron_fwd	GAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGGTAAGTGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
6_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACCCCTTCTTAATGTTTTTGGCATCTTC
6_rev	GGGTAGAATGGCGCTGGGCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGG
7_Apt_fwd	GCCAAAAACATTAAGAAGGGGCCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
7_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGGCCCTTCTTAATGTTTTTGGC
7_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCAGCGCCATTCTACCCACTC
7_Intron_fwd	GCCAAAAACATTAAGAAGGGGCCGTAAGTGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
7_Intron_rev	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCAGCGCCATTCTACCCACTC
7_rev	GAGTGGGTAGAATGGCGCTGCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGG
8_Apt_fwd	CCAAAAACATTAAGAAGGGGCCAGGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
8_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACCTGGGCCCTTCTTAATGTTTTTGG
8_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCGCCATTCTACCCACTCGAAG
8_Intron_fwd	CCAAAAACATTAAGAAGGGGCCAGGTAAGTGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
8_Intron_rev	CGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACCTGGGCCCTTCTTAATGTTTTTGG
8_rev	CTTCGAGTGGGTAGAATGGCGCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTGG

9_Apt_fwd	GAAGCTATGAAGCGCTATGGGCGTAAGTGATCAAGCAGCATGTTATGG
9_Apt_rev	CCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGCCCATAGCGCTTCATAGCTTC
9_fwd	CCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGTGAATACAAACCATCGGATCGTG
9_Intron_fwd	GAAGCTATGAAGCGCTATGGGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCG
9_Intron_rev	CGCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGCCCATAGCGCTTCATAGCTTC
9_rev	CACGATCCGATGGTTTGTATTCACTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTGG
A50.21_rev	AAGCTTCGTCAACTCCAGAAA
A50.47_fwd	ATAGCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAGGGAAGTCTACATCTT
Actin_99bp_fwd	CGGGACCTGACTGACTACCTC
Actin_99bp_rev	CTTCTCCTTAATGTACGCACG
Adapter_ATF_fwd	CTAGGGATCCTCTAGTCAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGC
Adapter_ATF_rev	GCCCTTCTTAATGTTTTTGGCATCTTCCATACGCGTCAGCTGACTAGAGGATCCCTAG
Adapter EIF_fwd	CAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGCGTATCAAGCAGCATG
Adapter EIF_rev	GTATCAAGCTTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCATAACATGCTGCTTGATACGCTTACGCC
Adapter_LBR_fwd	TCAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTATGTGTATCAAGCAGCATGTTATGG
Adapter_LBR_rev	GGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCATAACATGCTGCTTGATACACATACG
Adapter2_ATF_fwd	CTAGGGATCCTCTAGTCAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGG
Adapter2_ATF_rev	CCCATAACATGCTGCTTGATACACTCACGCCCTTCTTAATGTTTTTGGCATCTTCC
ATF4_12_1P_fwd	GTGAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGGGTCATCACAGACCAGAGAAAAGCTTGATACACCGGGGGCGGGTCGTCCAG CTGTG
ATF4_CI_rev	GCCGGCGGTCCCGTCTTCGAGTGGGTAGAATGGCGCTGGCTGAATGAGAATCAGAAGCCAACCTCC
ATF4_I1_fwd	GTGAGTACCGGGGCGGGTC
ATF4_I1_rev	CTGAATGAGAATCAGAAGCCAACCTCC
BamHI_fwd2	CTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCG
BamHI_fwd4	CTAGGGATCCTCTAGTCAGCTGACGC
BglII_Apt_fwd	CAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTGAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGGG
BglII_fwd	CAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTTTC
BglII_Ins6_b	GTGATGACCATAACATGCTGCTTGATACGACTCACGCCCTTCTTAATGTTTTTGGCATC
BglII_Ins6_f	CGCTAGGGATCCTCTAGTCAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGC
BglII_Ins6_r	CATCAAGGGTCCCATAGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCATAACATGCTGC
BglII_Ins7_b	GTGATGACCATAACATGCTGCTTGATACAGACTCACGCCCTTCTTAATGTTTTTGGCATC
BglII_Ins7_r	CATCAAGGGTCCCATGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCATAACATGCTGC
BglII_mitte_fwd	CATACCTCTTATCTTCTCCACAGCCAGCGCCATTCTACCCACTC
BglII_mitte_rev	GAGTGGGTAGAATGGCGCTGGCTGTGGGAGGAAGATAAGAGGTATG
BglII_rev	CCTGGTAGGTGGAAGCGTTTG
BglII_TK39_fwd	CATGTTACATACCTTATCTTCTCCACAGCATAGCAACCGACGTACGGCG
BglII_TK39_Pos2_fwd	GTTACATACCTTATCTTCTCCACAGCCTTCCGGAGGACAGACACATCG
BglII_TK39_Pos2_rev	CGATGTGTCTGTCTCCGGAAGGCTGTGGGAGGAAGATAAGAGGTATGAAC
BglII_TK39_rev	CGCCGTACGTGCGTTGCTATGCTGTGGGAGGAAGATAAGAGGTATGAACATG
BsrGI_rev2	GGAAGTCACGAAGGTGTACATGCTTTG
c-myc-NLS_C_fwd	GCCCCGAATTCACCATGTCTAG
c-myc-NLS_C_rev	TCACCGGTTTAATCCAGTTTCACGCGTTTCGCGGCCGGAGATCCACCGCCTCCTGAGTC
c-myc-NLS_N_fwd	AATTCACCATGCCGCGCGGAAACGCGTAAAAGTGGATGGAGGCGGTGGAT

c-myc-NLS_N_rev	CTAGATCCACCGCCTCCATCCAGTTTCACGCGTTTCGCGGCCGGCATGGTG
CATCAT_fwd	P-CGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCATCATATCAAGGTTACAAGACAGGC
CATCAT_rev	P-GTACGCCTGTCTTGTAACTTGATATGATGGCCCTTCTTAATGTTTTGGCATCTTCCATA
CI_ATF4_fwd	GAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTGAGTACCGGGGGCGGGTG
CI_TK39_fwd	CATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCATAGCAACCGACGTACGGCG
CI_TK39_Pos2_fwd	CATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGCCTTCCGGAGGACAGACACATCG
CI_TK39_Pos2_rev	CGATGTGTCTGTCCTCCGGAAGGCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTGGATG
CI_TK39_rev	CGCCGTACGTGCGTTGCTATGCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTGGATG
DL_OL_fwd1	ATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAG
DL_OL_fwd2	CATTAAGAAGGGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCGTACGGAGACCAATAGAAAC
DL_OL_rev1	TAACCTTGATACTTACGCCCTTCTTAATGTTTTGGCATCTTCCATACG
DL_OL_rev2	GCTGCTCGCCGGCGGTCCCGTCTTCGAGTGGGTAGAATGGCGCTGGCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTGGATG
EIF_12_1P_fwd	CATCACAGACCAGAGAAAAAGCTTGATACTATGGGAAAGGTCGCGGGCCCGGGTG
EIF1_CI_rev	GCCGGCGGTCCCGTCTTCGAGTGGGTAGAATGGCGCTGGCTGAAAAAAAAGGTTAAGCTCGTTCAGAG
EIF1_I1_fwd	GTAAGCTATGGGAAAGGTCGCGG
EIF1_I1_rev	CTGAAAAAAAAGGTTAAGCTCGTTCAGAG
HSV-TK39_fwd	CACACAGGATCCATGGCTTCGTACCCCGGCCATC
HSV-TK39_rev	TGTGTGGCGGCCGCTGTGTGGAGCTCTCAGTTAGCCTCCCCATCTCC
Ins_1_b	GTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACACGCC
Ins_1_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTGATCAAGCAGCATG
Ins_1_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACTTGATACTTGTATCAAGCTTTTCTCTGGTC
Ins_10_b	GTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACTTGTAACTTGATACTTACGCCCTTC
Ins_10_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTATCAAGG
Ins_10_r	TCTCCGTACGCCTGTCTGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTG
Ins_2_b	CAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACTACGCCCTTC
Ins_2_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAGTATCAAGCAGC
Ins_2_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACTTGATACTGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTG
Ins_3_b	CAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACTTACGCCCTTC
Ins_3_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTATCAAGCAG
Ins_3_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACTTGATACGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTG
Ins_4_b	CAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACCTTACGCC
Ins_4_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGGTATCAAGCAGC
Ins_4_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACTTGATAGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTG
Ins_6_b	CTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACTTACGCCCTTC
Ins_6_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTAGTATCAAG
Ins_6_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACTTGAGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
Ins_7_b	CAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACATACTTACGCC
Ins_7_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTATGTATCAAG
Ins_7_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACTTGGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTG
Ins_8_b	CTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACTGATACTTACGCCCTTC
Ins_8_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTATCAGTATC
Ins_8_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTAACTGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCA
Ins_9_b	CTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACCTTGATACTTACGC

Ins_9_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTATCAAGGGTATC
Ins_9_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTAAAGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
LBR_CI_fwd	GGCTATATACTTTCCCCTTTTGTTCAGCCAGCGCCATTCTACCCACTC
LBR_CI_rev	GAGTGGGTAGAATGGCGCTGGCTGAAACAAAAGGGGAAAGTATATAGCC
LBR_I9_fwd	GTATGTCTGGTTTTTTTTCTTCTAAATTC
LBR_I9_rev	CTGAAACAAAAGGGGAAAGTATATAGCC
Luc2_fwd2	GACTTCCCATTGGCCACCG
Luc2_fwd6	CCGCTAGGGATCCTCTAGTCAG
Luc2_fwd9	ATTAAGAAGGGCCAGCG
Luc2_rev2	CCTCGATATGTGCGTCGGTA
MIuI_CI_EIF1_fwd	CAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGCTATGGGAAAGGTCGCGG
MIuI_CI_LBR_fwd	CAGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTATGTCTGGTTTTTTTTCTTCTAAATTC
Short_1_b	CAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATAACTTACGCCC
Short_1_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTTATCAAGCAG
Short_1_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCTTATTTCATATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTG
Short_2_b	CAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGAACCTTACGCCCTTC
Short_2_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTTCAAGCAGC
Short_2_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCTTATTTCATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTG
Short_3_b	GCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTACTTACGCCCTTC
Short_3_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTAAGCAG
Short_3_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCTTATTCAAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
Stab_1_b	CTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGCCCTTC
Stab_1_r	GTCTCCGTACGCCTGTCTTGTCTTATTCAATATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
Stab_2_b	GCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTAATACACTTACGCCCTTC
Stab_2_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTGATTAAGC
Stab_2_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCTTATTTCAGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
Stab_4_b	CAAACCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTGCTTGATACACTTACGCCC
Stab_4_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTGATCAAGC
Stab_4_r	GTCTCCGTACGCCTGTCTTGTCTTATTTCAGTATCAAACCTTTTCTCTGGTCTGTG
Stab_5_b	GCTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTACTTGATACACTTACGCCCTTC
Stab_5_f	GCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTGATCAAG
Stab_5_r	GTCTCCGTACGCCTGTCTTGTCTTATTTCAGTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
Stab_8_b	CTTTTCTCTGGTCTGTGATGACCCATAACATGCTACTTAATACACTTACGCCCTTC
Stab_8_f	AGCTGACGCGTATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCGTAAGTGATTAAG
Stab_8_r	GTCTCCGTACGCCTGTCTTGTCTTATTCAATATCAAACCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
Stamm_1_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCCGATTTCAGTATCAAGCTTTTCTCTGG
Stamm_3_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCCGATTGTGTATCAAGCTTTTCTCTGG
Stamm_5_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCCGAAAGTGATCAAGCTTTTCTCTGG
Stamm_7_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCCGGTAAGTGATCAAGCTTTTCTCTGG
Stamm_9_r	TCTCCGTACGCCTGTCTTGTCCGTAAGTGATCAAGCTTTTCTCTGG
Stamm_fwd	AGCTGACGCGTATGGAAGATG
TetR_12_1P_rev	GTATCAAGCTTTTCTCTGGTCTGTGATG
TK_gespleiβt_rev	GTCGGTTGCTATGGCCGC

TK_gespleißt_rev2	GTCTGTCCTCCGGAAGGGCCCC
TK_PEST_fwd	CTGGCGCGCACGTTTCCCCGGGAGATGGGGGAGGCTAACTCTCACGGCTTCCCTCCCGAGGTGG
TK_PEST_rev	TGTGTGGCGGCCGCTGTGTGGAGCTCTCAGACGTTGATCCTGGCGCTGGCG
TK_Spleiß_fwd	CAGGTGTCCACTCCCAATT
TK_Spleiß_fwd2	CGCGCGGTACCTTATGGG
TK_total_rev	CAGCCTGGTCAACGCAG
TK_total_rev2	CCAAGCACGATGTTGGTGCC
TK39_BglII_12_1P	CATAACATGCTGCTTGATACTCACGCCCCAAGCACGATGTTGGTGC
_Pos2_rev	
TK39_BglII_12_1P_fwd	CAGGCTGCGGTTCTCGCGGCGTGAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGGGTC
TK39_BglII_12_1P_Pos2_f	GCACCAACATCGTGCTTGGGGCGTGAGTGTATCAAGCAGCATGTTATG
wd	
TK39_BglII_12_1P_rev	GACCCATAACATGCTGCTTGATACTCACGCCGCGAGAACGCGCAGCCTG
TK39_BglII_fwd	CAGGCTGCGGTTCTCGCGGCGTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTT
TK39_BglII_Pos2_fwd	GCACCAACATCGTGCTTGGGGCGTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTT
TK39_BglII_Pos2_rev	AACATCAAGGGTCCCATAGACTCACGCCCCAAGCACGATGTTGGTGC
TK39_BglII_rev	GAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTCACGCCGCGAGAACGCGCAGCCTG
TK39_Ci_12_1P_Pos2_rev	CCCATAACATGCTGCTTGATACTTACGCCCCAAGCACGATGTTGGTG
TK39_Ci_12_1P_fwd	CAGGCTGCGGTTCTCGCGGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGGGTC
TK39_Ci_12_1P_Pos2_fwd	CACCAACATCGTGCTTGGGGCGTAAGTGTATCAAGCAGCATGTTATGGG
TK39_Ci_12_1P_rev	GACCCATAACATGCTGCTTGATACTTACGCCGCGAGAACGCGCAGCCTG
TK39_Ci_fwd	CAGGCTGCGGTTCTCGCGGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCGTACG
TK39_Ci_Pos2_fwd	CACCAACATCGTGCTTGGGGCGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGG
TK39_Ci_Pos2_rev	CCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGCCCCAAGCACGATGTTGGTG
TK39_Ci_rev	CGTACGCCTGTCTTGTAACCTTGATACTTACGCCGCGAGAACGCGCAGCCTG
TK39_EcoRV_rev	CGGCTCGGGTACGTAGACGATATCG

Tabelle 5.9 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pDLP	Duales Luziferase-System mit Destabilisierungssequenz hinter Firefly-Luziferase	Kemmerer <i>et al.</i> 2014 ¹¹⁵
pWHE200_BglII	<i>luc+</i> -Gen mit β -Globin Intron 2	Diss. Julia Weigand, Goethe Universität Frankfurt
pWHE200_Psichcek	<i>luc+</i> -Gen mit chimärem Intron aus psiCHECK-2 (Promega)	BA Katharina Wiesemann, Goethe Universität Frankfurt
pWHE-cmv	Auffüllplasmid für alle Transfektionen	Diss. Janina Langner, TU Darmstadt
pCMV_TetR	Expressionsplasmid für TetR unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Diss. Janina Langner, TU Darmstadt
pFRTCD20	CD20 CDS hinter CMV-Promotor in pFRT zur stabilen genomischen Integration	Kim Beilstein, Goethe Universität, Frankfurt
pFRT/KB	eGFP hinter CMV-Promotor in pFRT zur stabilen genomischen Integration	Beilstein <i>et al.</i> 2014 ⁵⁷
pSIREN-HygTk39	enthält die CDS der hyperaktiven Mutante 39 der HSV-TK	Diss. Alexander Wittmann, Goethe Universität Frankfurt
pSP64	Vektorrückgrat das zur <i>run-off</i> Transkription verwendet wurde	Promega, USA
pCMV_rTetR	Expressionsplasmid für rTetR (5-fach Mutante rtTA-M2) unter der Kontrolle des CMV-Promotors	Urlinger <i>et al.</i> 2000 ⁸⁸

Tabelle 5.10 Konstruiert Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Kapitel
pCMV_NLS_TetR	pCMV_TetR-Derivat mit N-terminaler NLS an TetR	5.1.2.1
pCMV_TetR_NLS	pCMV_TetR-Derivat mit C-terminaler NLS an TetR	5.1.2.2
pDLP_CI	pDLP-Derivat mit chimärem Intron an Position 1	5.1.2.3
pDLP_CI_CATCAT	pDLP_CI-Derivat mit mutierter 5'SS	5.1.2.4
pFG1 - pFG3	pDLP_CI-Derivat mit Aptamervarianten 12_1R, 12_1P bzw. 12_1X 6 nt nach 5'SS	5.1.2.5
pFG2_mut	pFG2-Derivat mit zwei Punktmutation in der TetR-Bindetasche des Aptamers	5.1.2.6
pFG4 - pFG15	pDLP-Derivate mit inseriertem Riboregulator an Positionen 2 -13	5.1.2.7
pFG4_oA - pFG15_oA	pDLP-Derivate mit inseriertem chimärem Intron an Positionen 2 -13	5.1.2.8
pFG17 - pFG26	pDLP_CI-Derivate mit inseriertem TetR-Aptamer an unterschiedlichen Positionen nach der 5'SS	5.1.2.9
pFG27 - pFG31	pFG2-Derivate mit verlängertem Aptamerstamm	5.1.2.10
pFG32 - pFG34	pFG2-Derivate mit verkürztem Aptamerstamm	5.1.2.11
pFG35 - pFG39	pFG2-Derivate mit destabilisiertem Aptamerstamm	5.1.2.12
pFG46	pDLP-Derivat mit ATF4 Intron 1 und TetR-Aptamer an Position 1	5.1.2.13
pFG46_oA	pDLP-Derivat mit ATF4 Intron 1 an Position 1	5.1.2.14
pFG47	pDLP-Derivat mit EIF1 Intron 1 und TetR-Aptamer an Position 1	5.1.2.15
pFG47_oA	pDLP-Derivat mit EIF1 Intron 1 an Position 1	5.1.2.16
pFG48	pDLP-Derivat mit LBR Intron 9 und TetR-Aptamer an Position 1	5.1.2.17
pFG48_oA	pDLP-Derivat mit LBR Intron 9 an Position 1	5.1.2.18
pFG49	pDLP-Derivat mit β -Globin Intron 1 und TetR-Aptamer an Position 1	5.1.2.19
pFG49_oA	pDLP-Derivat mit β -Globin Intron 1 an Position 1	5.1.2.20
pFG50, pFG51	pFG49-Derivat mit TetR-Aptamer 7 bzw. 8 nt nach 5'SS	5.1.2.21
pFRTCD20-cmv	pFRTCD20-Derivat ohne CMV-Promotor vor CD20	5.1.2.22
pFRTCD20_CI	pFRTCD20-Derivat mit chimärem Intron	5.1.2.23
pFRTCD20_FG2	pFRTCD20-Derivat mit chimärem Intron und TetR-Aptamer 6 nt nach 5'SS	5.1.2.24
pFRTTK	pFRTCD20-Derivat, Austausch der CD20- gegen Tk39-CDS	5.1.2.25
pFRTTK_CI_P1/_P2	pFRTTK-Derivat mit chimären Intron an Position 1/2	5.1.2.26
pFRTTK_FG2_P1/_P2	pFRTTK_CI_P1/_P2-Derivat mit TetR-Aptamer	5.1.2.27
pFRTTK_BglII_P1/_P2	pFRTTK-Derivat mit β -Globin Intron an Position 1/2	5.1.2.28
pFRTTK_FG2_BglII_P1/_P2	pFRTTK_BglII_P1/_P2-Derivat mit TetR-Aptamer	5.1.2.29
pFRTTK_PEST	pFRTTK-Derivat mit Destabilisierungssequenz (PEST)	5.1.2.30
pFRTTK_CI_P1_PEST	pFRTTK_CI_P1-Derivat mit Destabilisierungssequenz (PEST)	5.1.2.31
pFRTTK_FG2_P1_PEST	pFRTTK_FG2_P1-Derivat mit Destabilisierungssequenz (PEST)	5.1.2.32
pFRTTK_BglII_P1_PEST	pFRTTK_BglII_P1-Derivat mit Destabilisierungssequenz (PEST)	5.1.2.33
pFRTTK_FG2_BglII_P1_PEST	pFRTTK_FG2_BglII_P1-Derivat mit Destabilisierungssequenz (PEST)	5.1.2.34

5.1.1 Übersicht über die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Basisvektoren

5.1.1.1 pCMV_TetR

Das 3928 bp große Plasmid pCMV_TetR wurde für die Überexpression vom TetR-Repressor TetR verwendet. Die CDS von TetR steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors (inkl. CMV-Enhancer), gefolgt von einem synthetischen PolyA-Signal um die Transkription von TetR in Eukaryoten zuverlässig zu terminieren. Zusätzlich enthält das Plasmid einen Replikationsursprung (ORI) für *E. coli* (Col E1) und das Ampicillin-Resistenzgen *bla* (β -Lactamase) unter der Kontrolle des natürlichen *bla*-Promotors. Die für die weiteren Klonierungen verwendeten Restriktionsendonukleasen sind angegeben (EcoRI, XbaI und AgeI). Die Plasmidkarte von pCMV_TetR ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

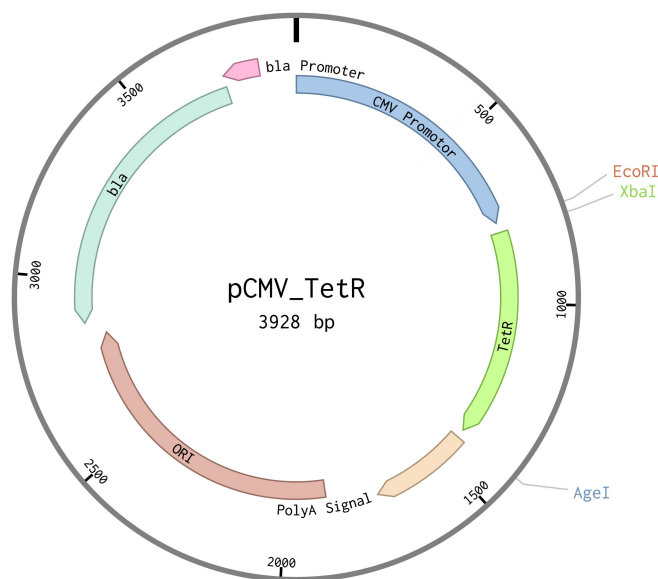


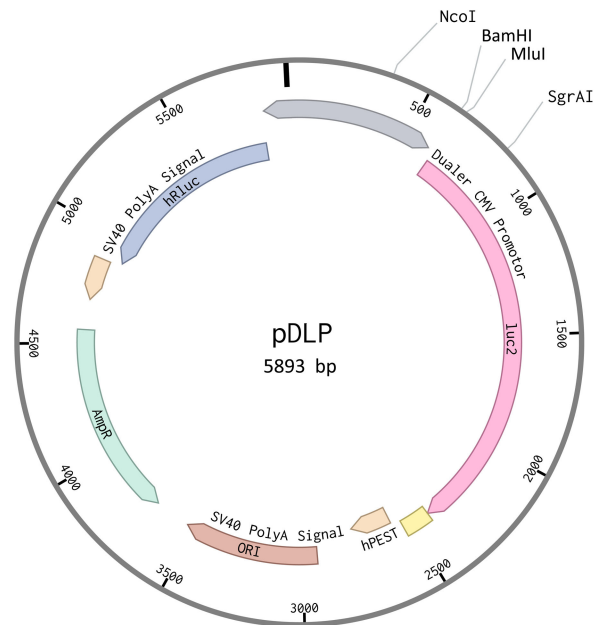
Abbildung 5.1 Plasmidkarte von pCMV_TetR.

Plasmidkarte von pCMV_TetR. Eingezeichnet sind der CMV-Promotor, die CDS von TetR mit synthetischem PolyA-Signal sowie der Replikationsursprung für *E. coli* (ORI) und die Ampicillin-Resistenz (*bla*, β -Lactamase) unter dem *bla*-Promotor.

5.1.1.2 pDLP

Das von Kemmerer *et al.* 2014¹¹⁵ konstruierte, 5893 bp große Plasmid pDLP enthält die Firefly-Luziferase *luc2* und die *Renilla*-Luziferase *hRluc* unter dem konstitutiven bidirektionalen CMV-Promotor. Dieser besteht aus zwei in entgegengesetzte Richtung zeigende, minimalen CMV-Promotoren mit dazwischenliegendem CMV-Enhancer-Element. Die Halbwertszeit der Firefly-Luziferase wurde durch Einbringen der Destabilisierungssequenz (PEST-Sequenz) aus der Ornithin-Decarboxylase reduziert¹⁶³. Beide Luziferase-Gene tragen das SV40-PolyA-Signal zur Termination der Transkription in Eukaryoten. Zusätzlich enthält das Plasmid einen Replikationsursprung (ORI) für *E. coli* (Col E1) und das Ampicillin-Resistenzgen *bla* (β -Lactamase) unter der Kontrolle des natürlichen *bla*-Promotors (kurz Amp^R). Die Plasmidkarte von pDLP und ein Sequenzausschnitt beginnend vom CMV-Enhancer bis zum Beginn des *luc2*-Gens ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

A



B

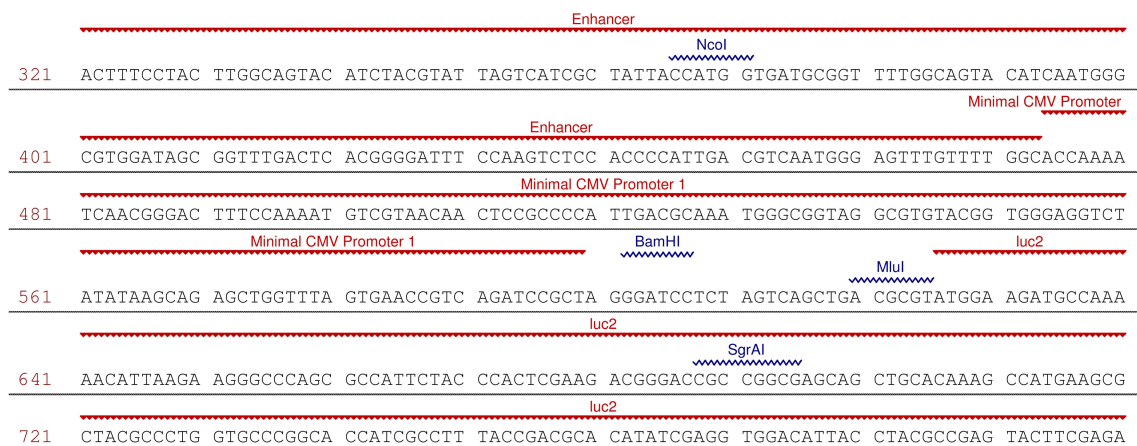


Abbildung 5.2 Plasmidkarte und Sequenzausschnitt von pDLP.

A. Plasmidkarte von pDLP. Eingezeichnet sind der duale CMV-Promotor, die Firefly-Luziferase *luc2* mit Destabilisierungssequenz (hPEST) aus der Ornithin-Decarboxylase, die *Renilla*-Luziferase *hRluc*, der Replikationsursprung für *E. coli* (ORI) und die Ampicillin-Resistenz (Amp^R , β -Lactamase). Die Transkription beider Luziferasen wird durch das SV40-PolyA-Signal terminiert. **B.** Sequenzausschnitt von pDLP. Gezeigt ist der Sequenzausschnitt beginnend von der Mitte des Enhancer-Elements über den minimalen CMV-Promotor bis zu den ersten 170 nt des Firefly-Luziferase-Gens. Die Erkennungsstelle der in den Klonierungen verwendeter Restriktionsendonukleasen (NcoI, BamHI, MluI und SgrAI) sind angegeben.

5.1.1.3 pFRTCD20

Das 5946 bp große Plasmid pFRTCD20, welches sich ursprünglich vom Plasmid pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) ableitet, exprimiert das CD20-Gen. Dieses steht unter der Kontrolle des konstitutiven CMV-Promotors und ist eingerahmt von einer 5' und einem 3'UTR. Die Transkription vom CD20-Gen wird durch das bGH-PolyA-Signal terminiert. Zusätzlich enthält das Plasmid das Gen, welches die Hygromycin-Resistenz vermittelt. Diesem wurde das Start-Codon deletiert (ΔATG), sodass eine Expression nur nach erfolgreicher genomischer Integration stattfinden kann (weitere Details hierzu¹³³). Des Weiteren enthält das Plasmid einen Replikationsursprung (ORI) für *E. coli* (Col E1) und das Ampicillin-Resistenzgen β -Lactamase

(Amp^R) unter der Kontrolle des natürlichen *bla*-Promotors. Die Plasmidkarte von pFRTCD20 und ein Sequenzausschnitt beginnend vom CMV-Promotor (hCMV) bis zum Beginn des CD20-Gens ist in Abbildung 5.3 dargestellt.

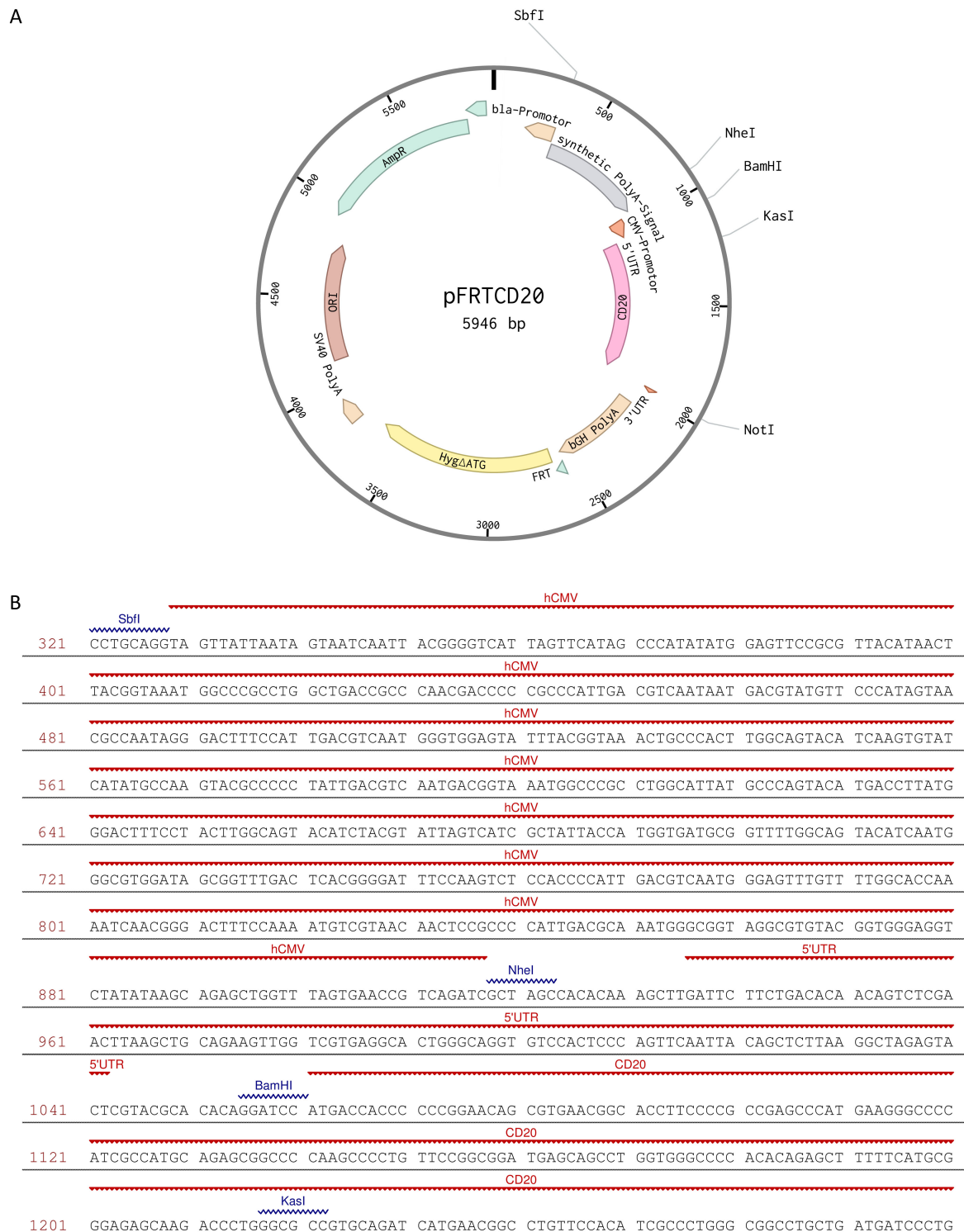


Abbildung 5.3 Plasmidkarte und Sequenzausschnitt von pFRTCD20.

A. Plasmidkarte von pFRTCD20. Eingezeichnet sind der CMV-Promotor, die CDS von CD20 mit 5' und 3' untranslatierten Bereichen sowie der bGH-PolyA-Sequenz zur Termination der Transkription, der Replikationsursprung für *E. coli* (ORI) und die Ampicillin-Resistenz (Amp^R, β -Lactamase) unter dem natürlichen *bla*-Promotor. Zusätzlich sind noch das Hygromycin-Gen (ohne ATG) zu sehen. **B.** Sequenzausschnitt von pFRTCD20. Gezeigt ist der Sequenzausschnitt beginnend mit dem CMV-Promotor (hCMV) bis zu den ersten 220

nt des CD20-Gens. Dazwischenliegend die Sequenz des 5'UTR. Die Erkennungsstelle der in den Klonierungen verwendeter Restriktionsendonukleasen (SbfI, NheI, BamHI und KsaI) sind angegeben.

5.1.2 Klonierung der in dieser Studie konstruierten Plasmide

Alle durchgeführten PCR-Reaktionen wurden mit der Q5-Polymerase durchgeführt. Inserts wurden entweder durch Overlap-PCR, Non-template PCR oder Hybridisierung von Oligonukleotiden hergestellt (Kapitel 5.2.6., 5.2.3.11). Zur ersten Überprüfung der klonierten Konstrukte wurden Kolonie-PCRs bzw. ein Test-Verdau durchgeführt. Im Anschluss wurden alle in dieser Studie klonierten Plasmide über Sequenzierung auf Korrektheit überprüft.

5.1.2.1 pCMV_NLS_TetR

Die Oligonukleotide c-myc_NLS_N_fwd und c-myc_NLS_N_rev wurden nach Hybridisierung phosphoryliert. Das Hybrid besaß die passenden Überhänge, um über EcoRI und XbaI in pCMV_TetR kloniert zu werden. Das Plasmid pCMV_TetR musste hierfür aus den *dam*-negativen ET12567 *E. coli*-Zellen präpariert werden, da die Methylierungsstelle GATC von *E. coli* mit der Restriktionsschnittstelle von XbaI überlappte. Die Plasmidkarte von pCMV_NLS_TetR ist in Abbildung 5.4 zu finden.

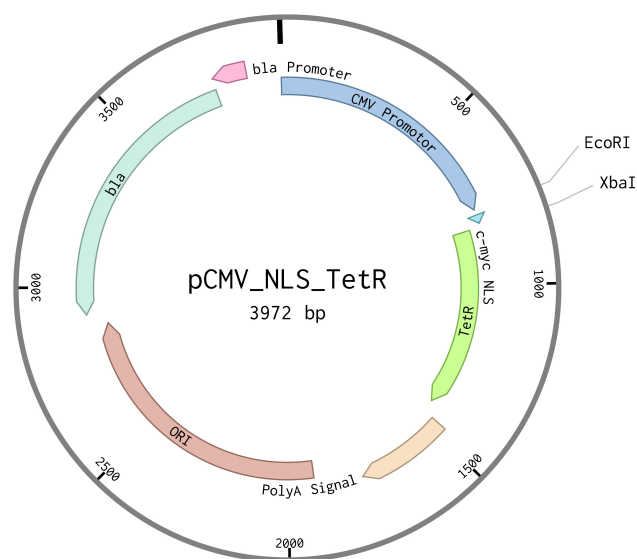


Abbildung 5.4 Plasmidkarte von pCMV_NLS_TetR.

5.1.2.2 pCMV_TetR_NLS

Die Oligonukleotide c-myc_NLS_C_fwd und c-myc_NLS_C_rev wurden in einer PCR mit pCMV_TetR als Matrize eingesetzt. Das entstandene Fragment (685 bp) wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und über AgeI und EcoRI in pCMV_TetR kloniert. Die Plasmidkarte von pCMV_TetR_NLS ist in Abbildung 5.5 zu finden.

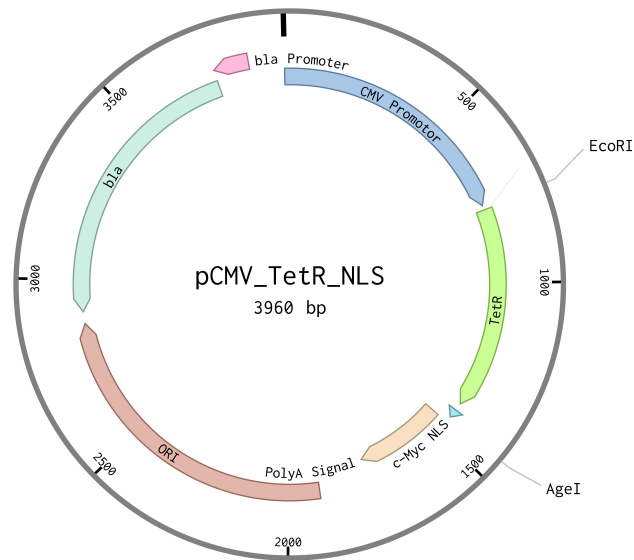


Abbildung 5.5 Plasmidkarte von pCMV TetR-NLS.

5.1.2.3 pDLP_CI

In einer PCR-Reaktion mit den vier Oligonukleotiden DL_OL_fwd1/2 und DL_OL_rev1/2 wurden gleichzeitig Fragmente aus pDLP und pWHE200_Psichcheck amplifiziert. Die drei entstehenden Fragmente wurden in der gleichen Reaktion durch die außenliegenden Oligonukleotide DL_OL_fwd1 und DL_OL_rev2 in einem Overlap-PCR-ähnlichem Mechanismus zu einem großen Fragment vereint (474 bp). Das entstandene PCR-Produkt enthielt somit die Firefly-Luziferase *luc2* unterbrochen vom chimären Intron aus dem Vektor pWHE200_Psichcheck. Zusätzlich wurden durch die verwendeten Oligonukleotide zwei Punktmutationen ins chimäre Intron eingefügt, welche eine BsiWI-Schnittstelle für weitere Klonierungen erzeugten. Das entstandene PCR-Produkt wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und über NcoI und SgrAI in pDLP kloniert. Hierbei musste ein sequentieller Verdau erfolgen. Nach NcoI-Verdau wurde das Produkt über ethanolische Fällung aufgereinigt und im Anschluss mit SgrAI verdaut. Die Plasmidkarte von pDLP_CI ist in Abbildung 5.6 zu finden.

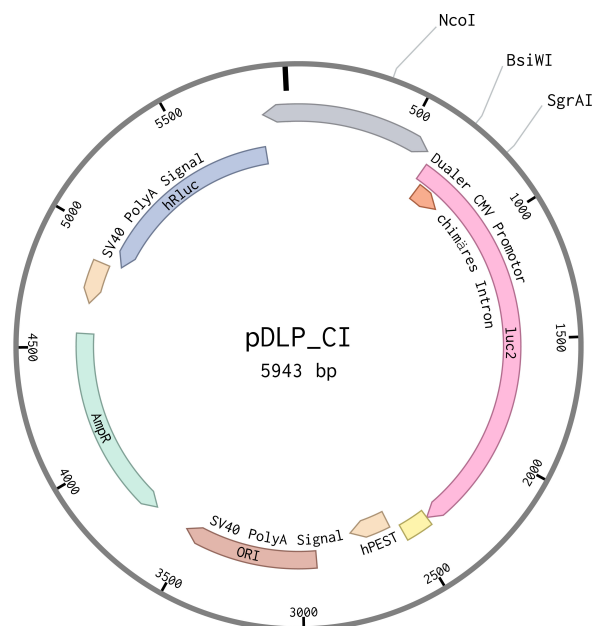


Abbildung 5.6 Plasmidkarte von pDLP_CI.

5.1.2.4 pDLP_CI_CATCAT

Die phosphorylierten Oligonukleotide CATCAT_fwd und CATCAT_rev wurden nach Hybridisierung über MluI und BsiWI in pDLP_CI kloniert. Die Oligonukleotide wurden so entworfen, dass das Hybrid bereits die passenden Überhänge von MluI bzw. BsiWI besaß.

5.1.2.5 pFG1, pFG2, pFG3

Die Oligonukleotid-Paare 12_1R_fwd/_rev (pFG1), 12_1P_fwd/_rev (pFG2) und 12_1X_fwd/_rev (pFG3) wurden jeweils miteinander hybridisiert. Mittels PCR-Reaktion wurden die überhängenden Enden aufgefüllt. Die aufgefüllten Hybride wurden über MluI und BsiWI in pDLP_CI kloniert.

5.1.2.6 pFG2_mut

Die Mutation der Aptamerdomäne von pFG2 wurde mittels Non-template PCR durchgeführt. Nach Amplifikation von 12_1P_mut_f, 12_1P_mut_r und 12_1P_mut_b wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und über MluI und BsiWI pDLP_CI kloniert.

5.1.2.7 pFG4 – pFG15 & pFG4_oA – pFG15_oA

Für die Klonierung der verschiedenen Intronpositionen wurde sowohl das Intron (pFG4_oA – pFG15_oA), als auch das Aptamer-enthaltende Intron (pFG4 – pFG15) an die jeweiligen Positionen innerhalb des Luziferase-Gens mittels Overlap-PCR kloniert. Für jedes Konstrukt wurden im ersten Schritt drei PCR-Reaktionen durchgeführt (A, B und C). Die verwendeten Oligonukleotidkombinationen sind in Tabelle 5.11 aufgelistet. Nach erfolgter PCR wurden die Fragmente über Gelelektion aufgereinigt und für den zweiten Schritt der Overlap-PCR eingesetzt. Hierfür wurden bei allen Konstrukten die Fragmente A, B und C mit den Oligonukleotiden BamHI_fwd2 und BsrGI_rev2 amplifiziert. Nach erfolgter PCR wurden die Produkte aus einem Agarosegel aufgereinigt und über BamHI und BsrGI in pDLP kloniert.

Tabelle 5.11 Oligonukleotidkombinationen für die Overlap-PCR von pFG4 – pFG15 & pFG4_oA – pFG15_oA.

Name	Intron-position	Rkt. ^a	Matrize	Vorwärts-oligonukleotid	Rückwärts-oligonukleotid
pFG4_oA	2	A	pDLP	BamHI_fwd2	3_Intron_rev
		B	pDLP	3_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	3_Intron_fwd	3_rev
pFG4		A	pDLP	BamHI_fwd2	3_Apt_rev
		B	pDLP	3_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	3_Apt_fwd	3_rev
pFG5_oA	3	A	pDLP	BamHI_fwd2	4_Intron_rev
		B	pDLP	4_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	4_Intron_fwd	4_rev
pFG5		A	pDLP	BamHI_fwd2	4_Apt_rev
		B	pDLP	4_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	4_Apt_fwd	4_rev
pFG6_oA	4	A	pDLP	BamHI_fwd2	5_Intron_rev
		B	pDLP	5_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	5_Intron_fwd	5_rev
pFG6		A	pDLP	BamHI_fwd2	5_Apt_rev

pFG7_oA	5	B	pDLP	5_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	5_Apt_fwd	5_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	6_Intron_rev
pFG7	5	B	pDLP	6_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	6_Intron_fwd	6_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	6_Apt_rev
pFG8_oA	6	B	pDLP	6_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	6_Apt_fwd	6_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	7_Intron_rev
pFG8	6	B	pDLP	7_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	7_Intron_fwd	7_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	7_Apt_rev
pFG9_oA	7	B	pDLP	7_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	7_Apt_fwd	7_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	9_Intron_rev
pFG9	7	B	pDLP	9_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	9_Intron_fwd	9_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	9_Apt_rev
pFG10_oA	8	B	pDLP	9_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	9_Apt_fwd	9_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	10_Intron_rev
pFG10	8	B	pDLP	10_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	10_Intron_fwd	10_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	10_Apt_rev
pFG11_oA	9	B	pDLP	10_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	10_Apt_fwd	10_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	11_Intron_rev
pFG11	9	B	pDLP	11_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	11_Intron_fwd	11_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	11_Apt_rev
pFG12_oA	10	B	pDLP	11_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	11_Apt_fwd	11_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	12_Intron_rev
pFG12	10	B	pDLP	12_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	12_Intron_fwd	12_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	12_Apt_rev
pFG13_oA	11	B	pDLP	12_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	12_Apt_fwd	12_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	13_Intron_rev
pFG13	11	B	pDLP	13_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	13_Intron_fwd	13_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	13_Apt_rev
pFG14_oA	12	B	pDLP	13_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	13_Apt_fwd	13_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	14_Intron_rev
pFG14	12	B	pDLP	14_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	14_Intron_fwd	14_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	14_Apt_rev
pFG15_oA	13	B	pDLP	14_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	14_Apt_fwd	14_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	15_Intron_rev
pFG15	13	B	pDLP	15_fwd	BsrGI_rev2
		C	pDLP_CI	15_Intron_fwd	15_rev
		A	pDLP	BamHI_fwd2	15_Apt_rev
		B	pDLP	15_fwd	BsrGI_rev2
		C	pFG_2	15_Apt_fwd	15_rev

^a Entsprechende Reaktionsbezeichnung für jedes amplifizierte Teilstück der Overlap-PCR.

5.1.2.8 pFG17 – pFG26

Die Klonierung dieser Konstrukte wurde mittels Non-template PCR durchgeführt. Hierfür wurde je ein Vorwärts-, ein Rückwärts- und ein Brückenoligonukleotid eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotidkombinationen sind der Tabelle 5.12 zu entnehmen. Nach erfolgter PCR und Aufreinigung mittels PCR-Purification Kit wurden die Fragmente über MluI und BsiWI in pDLP_CI kloniert.

Tabelle 5.12 Oligonukleotidkombinationen für pFG17 – pFG26.

Name	Vorwärts-oligonukleotid	Rückwärts-oligonukleotid	Brücken-oligonukleotid
pFG17	Ins_1_f	Ins_1_r	Ins_1_b
pFG18	Ins_2_f	Ins_2_r	Ins_2_b
pFG19	Ins_3_f	Ins_3_r	Ins_3_b
pFG20	Ins_4_f	Ins_4_r	Ins_4_b
pFG21	Ins_5_f	Ins_5_r	Ins_5_b
pFG22	Ins_6_f	Ins_6_r	Ins_6_b
pFG23	Ins_7_f	Ins_7_r	Ins_7_b
pFG24	Ins_8_f	Ins_8_r	Ins_8_b
pFG25	Ins_9_f	Ins_9_r	Ins_9_b
pFG26	Ins_10_f	Ins_10_r	Ins_10_b

5.1.2.9 pFG27 – pFG31

Die in der Tabelle 5.13 angegebenen Oligonukleotidkombinationen wurden verwendet um ein Fragment aus pFG2 zu amplifizieren. Die entstandenen PCR-Produkte wurden aus einem Agarosegel aufgereinigt und im Anschluss über MluI und BsiWI in pDLP_CI kloniert.

Tabelle 5.13 Oligonukleotidkombinationen für pFG27 – pFG31.

Name	Template	Vorwärts-oligonukleotid	Rückwärts-oligonukleotid
pFG27	pFG2	Stamm_fwd	Stamm_1_r
pFG28	pFG2	Stamm_fwd	Stamm_3_r
pFG29	pFG2	Stamm_fwd	Stamm_5_r
pFG30	pFG2	Stamm_fwd	Stamm_7_r
pFG31	pFG2	Stamm_fwd	Stamm_9_r

5.1.2.10 pFG32 – pFG34

Klonierungsstrategie wie pFG17. Die verwendeten Oligonukleotidkombinationen sind der Tabelle 5.14 zu entnehmen.

Tabelle 5.14 Oligonukleotidkombinationen für pFG32 – pFG34.

Name	Vorwärts-oligonukleotid	Rückwärts-oligonukleotid	Brücken-oligonukleotid
pFG32	Short_1_f	Short_1_r	Short_1_b
pFG33	Short_2_f	Short_2_r	Short_2_b
pFG34	Short_3_f	Short_3_r	Short_3_b

5.1.2.11 pFG35 – pFG39

Klonierungsstrategie wie pFG17. Die verwendeten Oligonukleotidkombinationen sind der Tabelle 5.15 zu entnehmen.

Tabelle 5.15 Oligonukleotidkombinationen für pFG35 – pFG39.

Name	Vorwärts- oligonukleotid	Rückwärts- oligonukleotid	Brücken- oligonukleotid
pFG35	Stab_1_f	Stab_1_r	Stab_1_b
pFG36	Stab_2_f	Stab_2_r	Stab_2_b
pFG37	Stab_4_f	Stab_4_r	Stab_4_b
pFG38	Stab_5_f	Stab_5_r	Stab_5_b
pFG39	Stab_8_f	Stab_8_r	Stab_8_b

5.1.2.12 pFG49_oA und pFG49

Beide Plasmide wurden über Overlap-PCR generiert. Die Template- und Oligonukleotidkombinationen für die erste Stufe der Overlap-PCR ist der Tabelle 5.16 zu entnehmen. Für die zweite Stufe der Overlap-PCR wurden die Fragmente 1 und 3 (für pFG49_oA) bzw. 2 und 3 (für pFG49) mittels der Oligonukleotide BglII_fwd/BglII_Apt_fwd und BglII_rev amplifiziert und nach Gelelution über MluI und KasI in pDLP kloniert.

Tabelle 5.16 Oligonukleotidkombinationen für pFG49_oA und pFG49.

Nr.	Name	Matrize	Vorwärts- oligonukleotid	Rückwärts- oligonukleotid
1	pFG49_oA	pWHE200	BglII_fwd	BglII_mitte_rev
2	pFG49	pFG2	BglII_Apt_fwd	BglII_mitte_rev
3	pFG49_oA / pFG49	pDLP	BglII_mitte_fwd	BglII_rev

5.1.2.13 pFG50 und pFG51

Die Klonierung dieser Konstrukte wurde mittels Non-template PCR durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotidkombinationen sind der Tabelle 5.17 zu entnehmen. Nach erfolgter PCR und Aufreinigung der Produkte über das PCR-Purification Kit wurden die Fragmente über BamHI und SanDI in pFG49_oA kloniert.

Tabelle 5.17 Oligonukleotidkombinationen für pFG50 und pFG51.

Name	Vorwärts- oligonukleotid	Rückwärts- oligonukleotid	Brücken- oligonukleotid
pFG50	BglII_Ins6_f	BglII_Ins6_r	BglII_Ins6_b
pFG51	BglII_Ins6_f	BglII_Ins7_r	BglII_Ins7_b

5.1.2.14 pFG46_oA

Über gDNA von HeLa-Zellen wurde mittels der Oligonukleotide ATF4_I1_fwd und ATF4_I4_rev das Intron 1 des *ATF4*-Gens amplifiziert und über das CloneJet PCR Cloning Kit in den Vektor pJet1.2 kloniert. Nach Bestätigung der Sequenz durch Sequenzierung wurde das Intron mittels Cl_ATF_4_fwd und ATF_Cl_rev aus dem Klonierungsvektor pJet1.2 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und in einer zweiten PCR mit den Oligonukleotiden Adapter_ATF_fwd, Adapter_ATF_rev, BamHI_fwd4 und ATF4_Cl_rev amplifiziert. Nach Gelelution wurden das Produkt über BamHI und BbsI in pDLP kloniert.

5.1.2.15 pFG46

Das TetR-Aptamer wurde in pFG46_oA mittels Overlap-PCR eingeführt. Hierfür wurden in einer Auffüllreaktion die beiden Oligonukleotide Adapter2_ATF_fwd und Adapter2_ATF_rev zusammengebracht und in einer weiteren PCR ein Fragment aus pFG46_oA mit ATF_12_1P_fwd und ATF_CI_rev amplifiziert. Die beiden entstandenen Produkte wurden nach Aufreinigung über ein Agarosegel in einer weiteren PCR als Matrize eingesetzt und mit den Oligonukleotiden BamHI_fwd4 und ATF4_CI_rev amplifiziert. Das Produkt wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und über BamHI und BbsI in pDLP kloniert.

5.1.2.16 pFG47_oA

Über gDNA von HeLa-Zellen wurde mittels der Oligonukleotide EIF1_I1_fwd und EIF1_I1_rev das Intron 1 des *EIF1*-Gens amplifiziert und über das CloneJet PCR Cloning Kit in den Vektor pJet1.2 kloniert. Nach Bestätigung der Sequenz durch Sequenzierung wurde das Intron mittels MluI_CI EIF1_fwd und EIF1_CI_rev aus dem Klonierungsvektor pJet1.2 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und über MluI und BbsI in pDLP kloniert.

5.1.2.17 pFG47

Das TetR-Aptamer wurde in pFG47_oA mittels Overlap-PCR eingeführt. Hierfür wurden in einer Auffüllreaktion die beiden Oligonukleotide Adapter EIF_fwd und Adapter EIF_rev zusammengebracht und in einer weiteren PCR ein Fragment aus pFG47_oA mit EIF_12_1P_fwd und EIF_CI_rev amplifiziert. Die beiden entstandenen Produkte wurden aufgereinigt und in einer weiteren PCR als Matrize eingesetzt und mit den Oligonukleotiden Luc2_fwd und EIF_CI_rev amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und über MluI und BbsI in pDLP kloniert.

5.1.2.18 pFG48_oA

Über gDNA von HeLa-Zellen wurde mittels der Oligonukleotide LBR_I9_fwd und LBR_I9_rev das Intron 9 des *LBR*-Gens amplifiziert und über das CloneJet PCR Cloning Kit in den Vektor pJet1.2 kloniert. Nach Bestätigung der Sequenz durch Sequenzierung wurde das Intron mittels MluI_CI_LBR_fwd und LBR_CI_rev amplifiziert. Parallel wurde ein Fragment aus pDLP mit LBR_CI_fwd und BsrGI_rev2 amplifiziert. Beide Fragmente wurde aus einem Agarosegel aufgereinigt und in einer weiteren PCR als Matrizen eingesetzt und mit den Oligonukleotiden MluI_CI_LBR_fwd und BsrGI_rev2 amplifiziert. Nach erfolgter Gelelution wurde das Produkt über MluI und BsrGI in pDLP kloniert.

5.1.2.19 pFG48

Das TetR-Aptamer wurde in pFG48_oA mittels Overlap-PCR eingeführt. Hierfür wurden in einer Auffüllreaktion die beiden Oligonukleotide Adapter_LBR_fwd und Adapter_LBR_rev zusammengebracht und in einer weiteren PCR ein Fragment aus pFG48_oA mit LBR_12_1P_fwd und BsrGI_rev2 amplifiziert. Die beiden entstandenen Produkte wurden nach Aufreinigung in einer weiteren PCR als Matrize eingesetzt und mit den Oligonukleotiden Luc2_fwd und BsrGI_rev2 amplifiziert. Das Produkt wurde nach Aufreinigung aus einem Agarosegel über MluI und BsrGI in pDLP kloniert.

5.1.2.20 pFRTCD20-cmv

Nach dem Verdau von pFRTCD20 mit SbfI und NheI und anschließender Gelelution des Vektorrückgrates wurden die überhängenden Ende mittels Quick Blunting Kit exonukleolytisch verdaut und somit geglättet, sodass diese miteinander ligiert werden konnten.

5.1.2.21 pFRTCD20_CI und pFRTCD20_FG2

Die Konstrukte wurden mittels Overlap-PCR kloniert. Die PCR-Reaktionen für die erste Stufe wurden nach Tabelle 5.18 durchgeführt. Die einzelnen Reaktionen wurden mittels Gelelution aufgereinigt und in der zweiten Stufe der Overlap-PCR eingesetzt. Fragment 1, 3 und 5 (pFRTCD20_CI) bzw. 2, 4, und 5 (pFRTCD20_FG2) wurden mit CD20_fwd und CD20_rev amplifiziert und nach Gelelution über BamHI und KasI in pFRTCD20 kloniert.

Tabelle 5.18 PCR-Reaktionen für die Overlap-PCR für pFRTCD20_CI und pFRTCD20_FG2.

Fragment	Matrize	Vorwärts- oligonukleotid	Rückwärts- oligonukleotid
1	pFRTCD20	CD20_fwd	CD20CI_rev
2	pFRTCD20	CD20_fwd	CD20Apt_rev
3	pDLP_CI	CD20CI_fwd	CICD20_rev
4	pFG2	CD20Apt_fwd	CICD20_rev
5	pFRTCD20	CICD20_fwd	CD20_rev

5.1.2.22 pFRTTK

Die CDS des Tk39-Gens wurde mit den Oligonukleotiden HSV_TK39_fwd und HSV_TK39_rev vom Plasmid pSIREN-HygTK39 mittels Touchdown-PCR amplifiziert. Nach Gelelution wurde das Insert über BamHI und NotI in pFRTCD20 kloniert.

5.1.2.23 pFRTTK_CI_P1, pFRTTK_FG2_P1, pFRTTK_BgIII_P1, pFRTTK_FG2_BgIII_P1, pFRTTK_CI_P2, pFRTTK_FG2_P2, pFRTTK_BgIII_P2 und pFRTTK_FG2_BgIII_P2

Alle Konstrukte wurden mittels Overlap-PCR (Touchdown-Programm) hergestellt. Für die erste Stufe der Overlap-PCR sind in Tabelle 5.19 die Template- und Oligonukleotidkombinationen zusammengestellt. Jedes entstandene Fragment wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und in der zweiten Stufe gemäß Tabelle 5.20 eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden wieder über Gelelution aufgereinigt und anschließend über BamHI und EcoRV für Position1 (P1) bzw. mit BamHI und NotI für Position2 (P2) in pFRTTK kloniert.

Tabelle 5.19 Oligonukleotidkombinationen für Stufe 1.

Name	Rkt.	Matrize	Vorwärtsoligonukleotid	Rückwärtsoligonukleotid
pFRTTK_CI_P1	C1_1	pFRTTK	HSV_TK39_fwd	TK39_CI_rev
	C1_2	pDLP_CI	TK39_CI_fwd	CI_TK39_rev
	C1_3	pFRTTK	CI_Tk39_fwd	TK39_EcoRV_rev
pFRTTK_FG2_P1	CA1_1	pFRTTK	HSV_TK39_fwd	TK39_CI_12_1P_rev
	CA1_2	pFG2	TK39_CI_12_1P_fwd	CI_TK39_rev
	CA1_3	identisch mit C1_3		
pFRTTK_BglII_P1	B1_1	pFRTTK	HSV_TK39_fwd	TK39_BglII_rev
	B1_2	pDLP_CI	TK39_BglII_fwd	BglII_TK39_rev
	B1_3	pFRTTK	BglII_TK39_fwd	TK39_EcoRV_rev
pFRTTK_FG2_BglII_P1	BA1_1	pFRTTK	HSV_TK39_fwd	TK39_BglII_12_1P_rev
	BA1_2	pFG2	TK39_BglII_12_1P_fwd	BglII_TK39_rev
	BA1_3	identisch mit B1_3		
pFRTTK_CI_P2	C2_1	pFRTTK	HSV_TK39_fwd	TK39_CI_Pos2_rev
	C2_2	pDLP_CI	TK39_CI_Pos2_fwd	CI_TK39_Pos2_rev
	C2_3	pFRTTK	CI_Tk39_Pos2_fwd	TK39_EcoRV_rev
pFRTTK_FG2_P2	CA2_1	pFRTTK	HSV_TK39_Pos2_fwd	TK39_CI_12_1P_Pos2_rev
	CA2_2	pFG2	TK39_CI_12_1P_Pos2_fwd	CI_TK39_Pos2_rev
	CA2_3	identisch mit C2_3		
pFRTTK_BglII_P2	B2_1	pFRTTK	HSV_TK39_fwd	TK39_BglII_Pos2_rev
	B2_2	pDLP_CI	TK39_BglII_Pos2_fwd	BglII_TK39_Pos2_rev
	B2_3	pFRTTK	BglII_TK39_Pos2_fwd	TK39_EcoRV_rev
pFRTTK_FG2_BglII_P2	BA2_1	pFRTTK	HSV_TK3_Pos29_fwd	TK39_BglII_12_1P_Pos2_rev
	BA2_2	pFG2	TK39_BglII_12_1P_Pos2_fwd	BglII_TK39_Pos2_rev
	BA2_3	identisch mit B2_3		

Tabelle 5.20 Oligonukleotidkombinationen für Stufe 2.

Name	Matrizen	Vorwärts-oligonukleotid	Rückwärts-oligonukleotid
pFRTTK_CI_P1	C1_1/C1_2/C1_3	HSV_TK39_fwd	TK39_EcoRV_rev
pFRTTK_FG2_P1	CA1_1/CA1_2/CA1_3	HSV_TK39_fwd	TK39_EcoRV_rev
pFRTTK_BglII_P1	B1_1/B1_2/B1_3	HSV_TK39_fwd	TK39_EcoRV_rev
pFRTTK_FG2_BglII_P1	BA1_1/BA1_2/BA1_3	HSV_TK39_fwd	TK39_EcoRV_rev
pFRTTK_CI_P2	C2_1/C2_2/C2_3	HSV_TK39_fwd	HSV_TK39_rev
pFRTTK_FG2_P2	CA2_1/CA2_2/CA2_3	HSV_TK39_fwd	HSV_TK39_rev
pFRTTK_BglII_P2	B2_1/B2_2/B2_3	HSV_TK39_fwd	HSV_TK39_rev
pFRTTK_FG2_BglII_P2	BA2_1/BA2_2/BA2_3	HSV_TK39_fwd	HSV_TK39_rev

5.1.2.24 pFRTTK_PEST, pFRTTK_CI_P1_PEST, pFRTTK_FG2_P1_PEST, pFRTTK_BglII_P1_PEST und pFRTTK_FG2_BglII_P1_PEST

Um den angegebenen Konstrukten die PEST-Sequenz anzuhängen, wurde diese zuerst mit den Oligonukleotiden TK_PEST_fwd und TK_PEST_rev von pDLP amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde über ein Agarosegel aufgereinigt und über NotI und BssHII in die angegebenen Plasmide kloniert.

5.2 Methoden

5.2.1 Methoden mit *E. coli*

5.2.1.1 Anzucht, Ernte und Lagerung

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in flüssigem oder auf festem LB-Medium, supplementiert mit dem passenden Antibiotikum, für 16 h bei 37°C. Flüssigkulturen wurden konstant bei 150 rpm geschüttelt. Das Wachstum der Kulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Angeimpft wurde immer von frisch ausgestrichenen Platten bzw. von Vorkulturen (1:500). Geerntet wurde mittels Zentrifugation, für kleine Volumina 1 min bei 17000x g (1 – 4 ml), für große Volumina 15 min bei 5800x g (50 – 500 ml).

Die Kurzzeitlagerung (< 4 Wochen) erfolgte auf Petrischalen bei 4°C. Für die Langzeitlagerung wurden Glycerin-Stocks angelegt. Hierfür wurde 1 ml Flüssigkultur mit 15% (v/v) Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

5.2.1.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli* mittels $CaCl_2$

Nach dem Ausstreichen des DH5 α -Stocks auf LB-Platte und Inkubation für 16 h bei 37°C, wurde eine Kolonie verwendet um 4 ml einer ÜNK zu innokulieren. Am Folgetag wurde diese Kultur dafür verwendet um 200 ml LB-Medium anzuimpfen. Bei 37°C und 120 rpm wurde die Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,5 wachsen gelassen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Kultur geerntet, mit 100 ml eiskaltem 0,1M $CaCl_2$ gewaschen und final in 20 ml eiskaltem 0,1M $CaCl_2$ aufgenommen. Nach einer anschließenden einstündigen Inkubation auf Eis wurde Glycerin zugesetzt (Endkonzentration 15% (v/v)) und die Bakteriensuspension zu je 330 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefrosten. Die kompetenten Zellen wurden zur Langzeitlagerung bei -80°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Kompetenz der chemokompetenten *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan *et al.*¹⁸⁰ durchgeführt unter Verwendung von pUC19. CFU-Werte im Bereiche von 10^6 oder darüber wurden als ausreichend kompetent erachtet.

5.2.1.3 Transformation $CaCl_2$ -kompetenter *E. coli*-Zellen

Bei der Transformation von *E. coli* wurde zwei verschiedene Protokolle verwendet. Eine lange und eine kürzere Variante. Die längere Variante der Transformation wurde zur Transformation von Ligationsansätzen in *E. coli* eingesetzt, die kürzere für Transformationen von bereits präparierten Plasmiden (sog. Re-Transformation).

Für schwer zu klonierende Plasmide wurden Neb10 β -Zellen verwendet. Diese wurden streng nach Herstellerangaben verwendet.

5.2.1.4 Transformation von Ligationsansätzen

Für die Transformation wurden die bei -80°C gelagerten *E. coli*-Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Je 10 μ l Ligationsansatz wurden mit 100 μ l DH5 α versetzt und 1h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelle 60 sec bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und wieder 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 μ l LB-Medium wurden die Kultur eine Stunde bei 37°C und 800 rpm geschüttelt, bevor sie ausplattiert und 16 h bei 37°C inkubiert wurde.

5.2.1.5 Retransformation

Auf Grund der leichteren Transformierbarkeit von bereits präparierten Plasmiden konnte das Transformationsprotokoll gekürzt werden. Alle Inkubationsschritte wurden auf 1 min gekürzt und die Zellen wurden direkt nach dem Hitzeschock ausplattiert.

5.2.2 Methoden mit humanen Zellen

5.2.2.1 Kultivierung, Ernte und Lagerung

Jegliche Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle Kulturen wurden regelmäßig mittels genspezifischer PCR auf Mycoplasmen getestet¹⁸¹.

HeLa, Hek-293 und A549-Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) mit 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin kultiviert. Der verwendete Brutschrank wurde auf 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit eingestellt. Die Zellen wurden alle 3 – 4 Tage passagiert. Hierfür wurde das Medium mittels Vakuumpumpe entfernt und die Zellen mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min bei 37°C abtrypsiniert. Durch Zugabe von 5 ml Medium wurde die Reaktion gestoppt. 50 µl der Zellsuspension wurde mit gleicher Menge 0,4% Trypanblau versetzt um die Zelldichte im TC-10 Automated Cell Counter zu bestimmen. In 250 ml Zellkulturflaschen mit 25 ml Medium wurden üblicherweise 0,5 – 1,0 x 10⁶ HeLa-/A549-Zellen bzw. 1,0 – 2,5 x 10⁶ Hek-293 ausgesät. Die Zellzahl für HeLa, A549 und Hek-293 Zellen für unterschiedliche Zellkulturplatten sind Tabelle 5.21 zu entnehmen.

Tabelle 5.21 Zelldichte eukaryotischer Zellen für unterschiedliche Plattentypen.

Zellen	Plattentyp	Zellzahl	Medium (ml)
HeLa, A549	6-well	200000	4
	12-well	100000	2
	24-well	40000	1
	96-well	5000	0,1
Hek-293	6-well	500000	4
	12-well	250000	2
	24-well	125000	1
	96-well	12500	0,1

Zur Langzeitlagerung von humanen Zellen wurden diese wie oben angegeben geerntet, abzentrifugiert (4 min bei 300x g) und in Medium aufgenommen, welches mit 10% (v/v) DMSO supplementiert wurde. Aliquots zu 1 ml wurden in Cryo-Vials überführt und bei -80°C in einem Isopropanol-enhaltenden Gefriergerät eingefroren. Am Folgetag wurden die Cryo-Vials in flüssigen Stickstoff überführt.

5.2.2.2 Transiente Transfektion mit Lipofectamine 2000

Die Lipofektion gehört zu den Standardtechniken um Nukleinsäuren mit hoher Effizienz in eukaryotische Zellen zu bringen¹⁸². Lipofektionsreagenzien, wie Lipofectamine 2000, bestehen aus kationischen Lipiden, welche mit der negativ geladenen DNA Aggregate ausbildet, die mit der Plasmamembran verschmelzen können. Bei der Verwendung von Lipofectamine wurde sich streng an die Herstellerangaben von 2012 gehalten. Für 24-well Platten wurden 4×10^4 HeLa-Zellen bzw. $1,25 \times 10^5$ Hek-293 in 1 ml Medium am Tag vor der Transfektion ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion betrug die Konfluenz zwischen 80 und 90%. Alle folgenden Schritte wurden mit vorgewärmten Opti-MEM (37°C) durchgeführt. Für jeden Transformationsmix wurde 1 µl Lipofectamine mit 50 µl Opti-MEM versetzt und 5 min bei RT stehen gelassen. Parallel wurde die Nukleinsäuremischung mit Opti-MEM auf 50 µl aufgefüllt. Die Nukleinsäuremischung selbst bestand immer aus 1 µg DNA und wurde falls notwendig mit Auffüllplasmid (Leervektor) aufgefüllt. Nach dem Zusammenführen beider Proben wurden diese für 20 min bei RT inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde durch 500 µl Opti-MEM ersetzt und die Lipofectamine/DNA-Präzipitate wurden hinzugegeben. Die Platte wurde mehrmals in Form einer 8 geschwenkt, damit sich die Präzipitate in der Platte verteilen. Nach 2 h bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit wurde das Transfektionsgemisch entfernt und die Zellen bekamen frisches DMEM. Bei Bedarf wurde 50 µM f.c. Doxycyclin zugesetzt.

Für größere bzw. kleinere Platten wurde die Menge an Lipofectamine 2000, DNA und Opti-MEM auf Grund der den Zellen zur Verfügung stehenden Wachstumsfläche angepasst.

5.2.2.3 Duales Luziferase-Reportergen Assay

Zum Nachweis der Funktion und den Einfluss der Riboregulatoren auf das Spleißen zu untersuchen, wurde das duale Luziferase-Assay von Promega verwendet. Hierbei kann nicht nur die Aktivität der Firefly-Luziferase gemessen werden, sondern auch zu Zwecken der Normalisierung die Aktivität der Renilla-Luziferase. Beide Luziferasen selbst standen unter der Kontrolle eines bidirektionalen Promotors um etwaige Promotoreffekte auszuschließen. Die Zellen wurden nach Transfektion in An- bzw. Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert und 24 h später wurde das Dual-Glo® Luciferase Assay System nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde das überstehende Medium abgesaugt und 100 µl DMEM wurde hinzugegeben. Hierauf wurde je 100 µl Dual-Glo® Luziferase Reagenz gegeben und für 10 min inkubiert. Das Dual-Glo® Luciferase-Reagenz enthielt neben lysierenden Substanzen auch das Substrat für die Firefly-Luziferase enthielt (Luciferin, ATP und Magnesium). Die 200 µl Zelllysate wurden in eine weiße 96-well Platte überführt und am Infinite® M200 Fluoreszenz Plattenleser mit 1 sec Integrationszeit ausgelesen. Danach wurden zu jedem Ansatz 100 µl frisch angesetztes Dual-Glo® Stop&Glo® gegeben und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Das Dual-Glo® Stop&Glo®-Reagenz quenchte die Aktivität der Firefly-Luziferase und lieferte das Substrat für die Renilla-Luziferase (Coelenterazine). Die Lichtemission wurde wieder am Plattenleser aufgenommen. Für jede Reaktion wurden die relativen Lichteinheiten (*relative light units*, RLU) berechnet als Quotient aus Aktivität der Firefly- zu Renilla-Luziferase. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus Triplikaten berechnet. Alle Experimente wurden mindestens einmal wiederholt. Die Normalisierung aller Konstrukte geschah unter Zuhilfenahme der Konstrukte mit Intron ohne Aptamer.

5.2.2.4 Viabilitätstest alamarBlue

Zur Bestimmung der Zellviabilität bzw. Toxizität wurde alamarBlue® (Life technologies) verwendet. AlamarBlue® oder Resazurin ist ein Farbstoff, welcher in wässriger Lösung durch metabolisch aktive Zellen zu Resorufin reduziert wird. Hierbei kann nicht nur ein Farbumschlag festgestellt werden, sondern auch eine Zunahme an Fluoreszenz. Dies macht alamarBlue® im Vergleich zu anderen Viabilitätsassays wie WST-1 hochsensitiv.

Das Assay wurde nach Herstellerangaben ausgeführt. Hierfür wurden Hek-293-Zellen in eine 96-well Platte ausgesät, transfiziert und mit Doxycyclin und unterschiedlichen Konzentrationen GCV bzw. ACV behandelt. Als Positivkontrolle dienten Mock-transfizierte Zellen, als Negativkontrolle Zellen, die mit 10 µM Taxol® behandelt wurden. Nach 3- bis 5-tägiger Inkubation wurde zu je 100 µl Medium 10 µl alamarBlue®-Lösung gegeben und für 90 min bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde am Infinite® M200 Fluoreszenz Plattenleser mit folgenden Einstellungen ausgelesen: Anregungswellenlänge: 560 nm, Emission: 600 nm, Mehrfachmessung pro well (4x4), 10 Blitze, manuelle Verstärkung (75) und 20 µs Integrationszeit. Hintergrund (Nur Medium + alamarBlue®) wurde von allen Messwerten subtrahiert und die berechneten Mittelwerte der Triplikate wurden auf die Probe normiert, welche weder Doxycyclin noch GCV bzw. ACV erhalten hatte. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) wurde bestimmt durch die Exponentialfunktion $V(x) = V_0 * e^{(-K*x)}$ (V_0 = Viabilität unbehandelter Zellen, $-K$ = Ratenkonstante, x = Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in µM).

5.2.3 Methoden mit Nukleinsäuren

5.2.3.1 Quantifizierung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde in ng/µl UV-spektrophotometrisch bei 260 nm mit den NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer bestimmt. Als Referenz diente Wasser oder der verwendete Puffer. Zur Umrechnung in mol/l wurde der mittlere Extinktionskoeffizient pro Basenpaar von 660 g/mol verwendet.

5.2.3.2 Agarose- und Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Qualität und die Größe von DNA-Fragmenten wurde mittels Gelelektrophorese unter Verwendung von Agarosegelen bestimmt. Die Prozentigkeit der Agarose, 1, 2 oder 3% (w/v), richtete sich nach der zu untersuchenden Größe des Fragments. Hierfür wurde die Agarose in 1x TAE durch Erhitzen gelöst und in dafür vorgesehene Plastikschrälen mit Kamm zum Erkalten gebracht. Die DNA-Proben wurden, versetzt mit 6x DNA-Ladepuffer, in die Taschen des Gels geladen und bei 1 – 5 V/cm laufen gelassen. Im Anschluss wurden die Gele in einem Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) für 15 min gefärbt und unter UV-Licht (254 nm) fotografiert. Präparative Agarosegele wurden stets frisch angesetzt und unter längerwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten.

RNA-Fragmente wurden mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert. Abhängig von der Größe der zu erwartenden RNA-Fragmente wurden Prozentigkeiten zwischen 6 und 15% (v/v) eingesetzt. Denaturierende Gele enthielten zusätzlich 8 M Harnstoff und wurden in 1x TBE laufen gelassen. Zur Polymerisation des Polyacrylamides wurde 0,01 Vol. 10% APS und 0,001 Vol. TEMED zugesetzt. Die Proben wurden vor dem Gellauf 5 min auf 95°C in RNA-Ladepuffer erhitzt und danach schnell auf Eis abgekühlt (snap cooling). Die verwendeten Spannungen lagen zwischen 15 –

30 V/cm. Nicht-radioaktiv-markierte RNA wurde Ethidiumbromid-gefärbt, während radioaktiv-markierte RNAs mittels Phosphorimaging quantifiziert wurden.

5.2.3.3 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden im Rahmen dieser Arbeit, abhängig von der Applikation, auf drei Arten gefällt. Bei der Standard-Fällung handelt es sich um die ethanolische Fällung mit Natriumacetat (NaAc), welche im Rahmen dieser Arbeit für die meisten Anwendungen praktikabel war. Sollten kleine Mengen schnell und stark entsalzt werden, wie z.B. Ligationsansätze, wurde die Butanolfällung verwendet. Um nicht-inkorporierte, radioaktive Nukleotide nach Transkriptionen oder Phosphorylierungen zu entfernen wurde meist auf die Ammoniumacetat-Fällung zurückgegriffen.

5.2.3.4 Ethanolische Fällung mit Natriumacetat

Die Nukleinsäure-Mischung wurde versetzt mit 0,1 Vol. 3 M NaAc pH 6,5 und 2,5 Vol. Ethanol und für mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Nach Zentrifugation von 30 min bei 17000x g und 4°C wurde das Pellet einmal mit 0,5 Vol. 70% Ethanol gewaschen und für weitere 15 min zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in MQ aufgenommen.

5.2.3.5 Butanolfällung

Durch die geringe Löslichkeit von Wasser in Butanol, ist es nicht notwendig bei der Butanolfällung Salze hinzuzugeben. Die Nukleinsäure-Probe wird mit 9 Vol. Butanol versetzt, lange geschüttelt und direkt bei 17000x g und RT für mindestens 30 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 0,5 Vol. 70% Ethanol gewaschen und für weitere 15 min zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in MQ aufgenommen.

5.2.3.6 Fällung mit Ammoniumacetat

Die Fällung mit Ammoniumacetat benötigt große Mengen dieses Salzes, sodass das entstehende Pellet mindestens zweimal gewaschen werden sollte, da verschleppte Ammonium-Ionen Folgeanwendungen stark inhibieren können. Die Nukleinsäure-Mischung wird mit 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol. Ethanol versetzt und 10 min auf Eis inkubiert, bevor exakt 15 min bei 17000x g und RT zentrifugiert wurde. Das Pellet wurde zweimal mit 0,5 Vol. 70% Ethanol gewaschen und jedes Mal für weitere 15 min zentrifugiert. Nach Abziehen des Überstandes wurde das Pellet 5 min luftgetrocknet und in MQ aufgenommen.

5.2.3.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Gelen

Zur Aufreinigung von bestimmten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden diese nach Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht scharf ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Durch

doppeltes Waschen der Silica-Membran sowie eine 5-minütige Inkubation des Waschpuffers auf der Säule wurden die Probe nochmals stärker entsalzt.

Zur Aufreinigung von RNA-Molekülen aus denaturierenden Polyacrylamid-Gelen wurden diese mit einem Skalpell ausgeschnitten und in kleine Stücke zerteilt. Über Nacht wurden die Gelstücke in 0,3 M NaAc bei 4°C eingelegt und konnten dann mittels ethanolischer Fällung aufgereinigt werden.

5.2.3.8 Phenolisierung von Plasmid-DNA für *Run-off* Transkriptionen

Die für RNA-Synthesen eingesetzten Plasmide wurden über Phenolisierung aufgereinigt und so von RNase-Kontaminationen befreit. Hierfür wurde zur Plasmid-Lösung 1 Vol. PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, 25:24:1) gegeben, auf dem Vortexer geschüttelt und in ein vorbereitetes MaxTract-Röhrchen überführt. Dieses wurde entsprechend der Größe nach Herstellerangaben zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues MaxTract-Röhrchen überführt und mit 1 Vol. CI (Chloroform-Isoamylalkohol, 24:1) versetzt. Nach schütteln auf dem Vortexer wurde zentrifugiert und der wässrige Überstand zum Fällern mittels Ethanol und NaAc (Kapitel 5.2.3.4) der DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.2.3.9 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA wurde mit den entsprechenden Enzymen und Puffersystemen laut Herstellerangaben zur endonukleolytischen Spaltung eingesetzt. Um die Spaltreaktion nicht zu inhibieren wurde darauf geachtet, dass die Glycerinkonzentration 5% nicht überstieg. Die Berechnung der einzusetzenden Enzymmenge (Units) wurde über Formel I berechnet. Falls notwendig wurden die Restriktionsenzyme durch Inkubationen für 20 min bei 65- 80°C oder durch Zugabe von 5 mM EDTA bzw. 0,5% (w/v) SDS inaktiviert.

Formel I:

$$u = m_p \times \left(\frac{l_r \times n_p}{l_p \times n_r} \right) \div h$$

u = Enzymeinheiten; m_p = Masse der zu spaltenden dsDNA [ng]; l_r = Länge der Referenz-DNA [bp]; n_p = Anzahl der Schnittstellen des Enzyms in der zu schneidenden DNA; l_p = Länge der zu spaltenden DNA [bp]; n_r = Anzahl der Schnittstellen des Enzyms in der Referenz-DNA; h = Dauer des Restriktionsverdau in Stunden.

5.2.3.10 Dephosphorylierung und Phosphorylierung von Nukleinsäuren

Um eine Religation freier DNA-Enden, welche durch Restriktionsverdau entstanden sind, zu verhindern wurden diese mittels alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Die einzusetzende Menge an Enzym richtete sich nach der Menge an freien DNA-Enden, die mit Formel II berechnet wurden. Die Reaktionen wurden in 50 µl-Ansätzen bei 37°C inkubiert und im Anschluss hitzeinaktiviert.

Formel II:
$$\text{Freie DNA – Enden [pmol]} = m_p \times \frac{\text{pmol}}{660 \text{ pg}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \text{ } \mu\text{g}} \times \frac{1}{N} \times 2 \times \frac{l_p}{1000 \text{ bp}}$$

m_p = Menge an zu dephosphorylierender DNA in μg ; 660 pg = Durchschnittliches Molekulargewicht eines Basenpaars; $\text{pmol} \times 10^6 \text{ pg} / 1 \text{ } \mu\text{g}$ = Einheiten-Konversion; N = Anzahl der Nukleotide in kb; 2 = Zahl freier Enden in einem linearen DNA-Molekül; kb/1000 bp = Umrechnung von Kilobasen zu Basenpaaren.

Auf Grund der Festphasensynthese von chemisch synthetisierten Oligonukleotiden fehlt diesen am 5'-Ende das Phosphat, sodass diese nicht für eine Ligation eingesetzt werden können. Für die Phosphorylierung wurde 1 nmol an Oligonukleotid mit 10 mM ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase (PNK) in Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion für 5 min bei 65°C inkubiert (Hitzeninaktivierung) und wurde direkt für Ligationen eingesetzt.

Um nicht-radioaktiv transkribierte RNA 5' zu markieren, wurde diese nach obigem Protokoll dephosphoryliert. Nach ethanolischer Fällung mit NaAc wurde die RNA unter Verwendung von 1 μl radioaktivem [γ -P32]ATP (6000Ci/mmol) und der T4-PNK phosphoryliert.

5.2.3.11 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um kleinere DNA-Fragmente (< 100 bp) zu klonieren wurden diese direkt als Oligonukleotide in *sense*- und *antisense*-Richtung bestellt und durch Hybridisierung zusammengefügt. Hierfür wurden je 100 pmol Oligonukleotid in Wasser gemixt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Danach wurde das Reaktionsgemisch langsam auf RT abgekühlt und im Anschluss in einem 3%igen Agarosegel überprüft.

Für eine effiziente Ligation wurden die Oligonukleotide so designt, dass diese nach Hybridisierung passende Überhänge zu den Restriktionsschnittstellen des zugehörigen Plasmidrückgrats besitzen. Des Weiteren wurden die Hybride 5'-phosphoryliert (Kapitel 5.2.3.10).

5.2.3.12 Ligation von DNA-Molekülen

25 ng verdautes Plasmidrückgrat wurde mit 5-fach molaren Überschuss an verdautem DNA-Insert, 1 mM ATP und 400 U T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer in einem Reaktionsvolumen von 20 μl für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 μl Ligationsansatz in CaCl_2 -kompetente DH5 α transformiert. Bei schwierigen Ligationen wurde die Inkubation der Ligation über Nacht bei 16°C durchgeführt und die Ligationsansätze in Neb10 β nach Herstellerangaben transformiert.

5.2.4 RNA-Extraktion aus humanen Zellen

$1,0 \times 10^5$ HeLa- bzw. $2,5 \times 10^5$ Hek-293-Zellen wurden in einer 12-well Platte ausgesät und am Folgetag entsprechend transfiziert. 24 h nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit 37°C-warmen 1x PBS gewaschen und in 400 μl Trizol aufgenommen. Zur Lyse der Zellen wurden diese mehrmals auf- und abpipettiert, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 80 μl Chloroform, wurden die Suspension 15 sec auf dem Vortexer

geschüttelt und anschließend in ein vorbereitetes 1,5 ml MaxTract-Röhrchen überführt. Dieses wurde für 5 min bei 16000x g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein frisches 1,5 ml MaxTract-Röhrchen überführt und 200 µl Chlorform wurden zugesetzt. Beides wurde durch starkes Schütteln vermischt und für 5 min bei 16000x g und 4°C zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und 0,75 µl Glycoblu, zur einfacheren Erkennung des Pellets, gefällt. Hierfür wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert und anschließend 30 min bei 17000x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und nach Abziehen des Überstandes 5 min an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in 33 µl MQ aufgenommen und mit 4 µl TURBO-DNase-Puffer und 3 µl TURBO-DNase versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Aufgereinigt wurde der Ansatz über ethanolische Fällung. Das Pellet wurde anschließend in 50 µl MQ aufgenommen. Zur Qualitätskontrolle wurde nach Verdünnung der Proben auf 100 ng/µl je 500 ng auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und nach Ethidiumbromidfärbung fotografiert. Die RNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

5.2.5 cDNA-Synthese

Um die präparierte RNA untersuchen oder quantifizieren zu können, wurde diese in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das GeneAmp RNA PCR Kit verwendet. Das Umschreiben wurde mit Random Hexameren (N_6) durchgeführt, was den Vorteil hatte, dass eine cDNA-Synthese nicht nur für eine genspezifische Untersuchungen verwendet werden konnte, sondern auch dazu genutzt wurde um Haushaltsgene in der gleichen Probe zu quantifizieren.

1 µg total RNA wurde mit 5 mM $MgCl_2$, je 1 mM dNTPs, 5 µM Random Hexameren sowie 40 U Ribolock und 100 U MuLV Reverse Transkriptase in 40 µl Reaktionsvolumen und passenden Puffersystem zusammengebracht und wie folgt temperiert: 10 min bei 20°C, 15 min bei 42°C, 5 min bei 99°C. Im Anschluss wurde die Reaktion auf 200 µl mit MQ aufgefüllt und als Matrize für Spleiß-PCRs und qRT-PCRs verwendet.

5.2.6 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde zu Zwecken der Klonierung (Einbringen von Restriktionsschnittstellen, Mutagenese, Amplifizierung von Genabschnitten und Auffüllreaktionen für hybridisierte Oligonukleotide), für Kolonie-PCRs, für RT-PCR-Analysen und zur Quantifizierung mittels qRT-PCR (siehe Kapitel 5.2.7) eingesetzt. Im Allgemeinen wurde für die PCR pDNA, gDNA, Bakterienzellen, cDNA oder PCR-Amplikons eingesetzt. In 100 µl Reaktionen wurden 1 -100 ng DNA-Matrize mit 30 pmol Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotid, je 20 nmol dNTP und 10 U Taq DNA-Polymerase bzw. 2 U Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase im entsprechenden Puffersystem eingesetzt. Falls notwendig wurde in Reaktionen mit Q5-Polymerase der mitgelieferte GC-Enhancer zugesetzt. Die Matrizen wurden initial denaturiert (3 min bei 98°C) und anschließend durch 25 – 35 Zyklen bestehend aus Denaturierung (10 – 30 sec bei 98°C), Hybridisierung (20 – 30 sec bei 50 – 60°C) und Elongation (30 – 60 sec/kb des Amplifikats bei 72°C) amplifiziert. Abschließend wurden eine finale Elongation (5 min bei 72°C) durchgeführt.

Auffüllreaktionen für hybridisierte Oligonukleotide bestanden nur aus einem Zyklus, welchem nach Hybridisierung der Oligonukleotide eine 30 minütige Elongation folgte.

Bei der *overlap extension polymerase chain reaction* (kurz Overlap-PCR)¹⁸³, die üblicherweise aus zwei Stufen bestand, wurde in der ersten Stufe zwei oder mehr Fragmente amplifiziert, welche mindestens einen homologen Bereich von 20

bp an den Enden teilten. Die Fragmente aus der ersten Stufe wurden nach Aufreinigung als Matrize für die zweite Stufe eingesetzt. Hierbei wurden die Fragmente über die homologen, endständigen Bereichen hybridisiert und mit den am weitesten außen liegenden Oligonukleotiden, welche in Stufe 1 eingesetzt wurden, amplifiziert. Ziel der Overlap-PCR ist es mehrere DNA-Fragmente in einem zusammenzuführen. In dieser Arbeit wurde diese Methode meist dazu verwendet um ein bestimmtes Fragment innerhalb eines anderen Fragmentes zu platzieren (z.B. Intron in Reportergen).

Bei der Non-template PCR wurde keine Matrize eingesetzt¹⁸⁴. Stattdessen wurden drei Oligonukleotide verwendet, welche aus Vorwärts-, Rückwärts- und Brückenoligonukleotid bestand. Das Brückenoligonukleotid, überlappend mit sowohl Vorwärts-, als auch Rückwärtsoligonukleotid wurde mit 3 pmol (1/10 der normalen Menge) in die Reaktion gegeben.

Für PCR-Reaktionen, die ein hohes Maß an Nebenprodukten aufwiesen, wurde die Touchdown-PCR verwendet. Hier wurde zu den 35 Zyklen zusätzlich weitere 10 Zyklen vorangestellt, in denen die Hybridisierungstemperatur 10°C höher war und im Laufe der 10 Zyklen um je 1°C/Zyklus abnahm.

5.2.7 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung einzelner RNA-Spezies wurde nach cDNA-Synthese unter Verwendung von SYBR Green-Chemikalien (Fast SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems) die qRT-PCR eingesetzt. Hierfür wurde in 20 µl Reaktionen 4 µl cDNA mit je 1 µl Vorwärts-, wie Rückwärtsoligonukleotid und 10 µl 2x Fast SYBR Green Master Mix gemischt und auf einem StepOnePlus Real-time PCR System laufen gelassen mit den Standard-Einstellungen für Fast SYBR Green-Mixe und anschließender Schmelzkurve um die abgelaufene Reaktion zu überprüfen. Die relative Genexpression wurde kalkuliert unter Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode¹¹⁷. Alle Experimente wurden mindestens einmal wiederholt mit technischen Duplikaten.

5.2.8 *In vitro*-Transkription

Um große Mengen RNA zu synthetisieren, wurde diese von linearisiertem pSP64, welches einen T7-Promotor enthielt, transkribiert. Die Linearisierung wurde mit EcoRI durchgeführt und anschließend mittels Phenolisierung aufgereinigt (Kapitel 5.2.3.8). Für eine 10 ml Transkription wurde das linearisierte Plasmid (1 – 3 mg) gemischt mit 200 mM Tris-Cl pH 8,0, 20 mM Mg(Ac)₂, 50 mM DTT, 2 mM Spermidin, je 4 mM NTP und 20 µg T7 RNA-Polymerase. Die Reaktion wurde 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf ein denaturierendes PAA-Gel zur Auftrennung aufgetragen (Kapitel 5.2.3.7). Die Produktbande wurde ausgeschnitten und über Nacht in 300 mM NaAc pH 6,5 eluiert und anschließend ethanolisch gefällt (Kapitel 5.2.3.4).

5.2.9 Proteinextraktion

In dieser Arbeit wurde sowohl Gesamtprotein präpariert, als auch Kern- und Cytoplasmafraktion getrennt. Für beide Präparationsmethoden wurden HeLa bzw. Hek-293-Zellen in 6-well Platten ausgesät. Zur Präparation von Gesamtprotein wurden die Zellen bevor sie in 320 µl Lyse-Puffer aufgenommen wurden 1x mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis in Lyse-Puffer inkubiert und im Anschluss in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 15 min bei 17000x

g und 4°C zentrifugiert. Im klare Überstand war der Gesamtproteinextrakt enthalten. Zur Präparation von Kern- und Cytoplasmafraktion wurden die Zellen 1x mit 1x PBS gewaschen, mittels TE abtrypsiniert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 500x g und RT pelletiert. Das Zellpellet wurde mit 500 µl kaltem 1x PBS gewaschen und wieder durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellepellet wurde in 75 µl CE-Puffer aufgenommen und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden weitere 75 µl CE-Puffer (+ IGEPAL CA-630) hinzugegeben und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde für 3 min bei 8500x g und 4°C zentrifugiert. Im Überstand war die Cytoplasmafraktion enthalten. Das Pellet wurde in 75 µl NE-Puffer aufgenommen und 1 min auf dem Vortexer geschüttelt. Danach wurde es 3 mal wiederholt für 15 min bei -80°C eingefroren und bei 37°C aufgetaut. Zwischen den Zyklen wurde auf dem Vortexer die Probe geschüttelt. Nach den Einfrier-Auftau-Zyklen wurde die Probe für 15 min bei 17000x g und 4°C zentrifugiert. Im klare Überstand war der Kernextrakt enthalten.

Alle Proteinproben wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration durch Bradford in 1x Protein-Ladepuffer bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

5.2.10 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde nach bekanntem Protokoll durchgeführt¹⁸⁵. Vor jeder Proteinbestimmung nach Bradford wurde durch Verdünnungsreihen von BSA eine Eichgerade erstellt. Die BSA-Stockkonzentration wurde unter Verwendung des Lambert-beersches Gesetz spektrophotometrisch bestimmt¹⁸⁶. Basis hierfür war das Molekulargewicht von 66,46 kDa und ein molarer Extinktionskoeffizient von 43824 L/(mol x cm)¹⁸⁷.

5.2.11 Westernblot

Alle Proteinproben für Westernblot (WB) wurden für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben auf RT abgekühlt. Je 10 µg/Spur und Probe wurden in ein vorgegossenes Gradientengel (Mini Protein TGX Precast Gel 8 – 16%) geladen und 45 min bei 150 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurde das Gel auf die TransBlot Turbo Transfer PVDF-Membran überführt und in der BioRad FastBlot-Apparatur für 7 min transferiert. Nach dem Transfer der Proteine aus dem Gel auf die PVDF-Membran wurde diese in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 2% Blockier-Reagenz (ECL Prime blocking Agent (GE) in 1x TBST) überschichtet und 1h rollend bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Erstantikörper und nach 3-maligem Waschen (1x TBST) mit dem Zweitantikörper für je 1 h rollend bei RT inkubiert. Vor dem Entwickeln des WB wurde die Membran 3-malig gewaschen (1x TBST) und anschließend für 5 min mit Clarity Western ECL-Substrat überschichtet. Die Membranen wurden über das ChemiDoc™ MP System (BioRad) ausgelesen und, falls gewünscht, quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte über Integration der Pixelintensität für jedes Signal. Zur Langzeitlagerung konnten die Membranen bei 4°C in 1x TBST gelagert werden.

5.2.12 Filterretention

Die Filterretention wurde mit der sog. Bio-Dot® Microfiltration-Apparatur (BioRad) durchgeführt. Ziel war es mit Hilfe steigender Menge Ziel-Molekül bei konstanter Menge radioaktive markierter-RNA eine Bindekonstante zu bestimmen. Hierfür wurden geeignete Verdünnungsreihen an Zielmolekül angefertigt. In 96-well Platten mit Rundboden wurden

jeweils 20 µl RNA-Mastermix (RNA in 1x PBS pH 7,5 mit 3 mM MgCl₂) mit 5 µl Zielmolekül bei 37°C für eine halbe Stunde inkubiert. Parallel wurde die Nitrozellulose-Membran in 1x PBS äquilibriert. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran in die Filterretentionsapparat gespannt (siehe Abbildung 5.7). Das RNA-Zielmolekül-Gemisch wurde spaltenweise über die Apparatur mit Hilfe einer 8-Kanalpipette filtriert. Unter ständigem Vakuum wurde zunächst eine Spalte mit 200 µl Selektionspuffer gespült. Dann wurden 20 µl des RNA-Protein-Gemischs aufgetragen, anschließend wurde zweimal mit 200 µl Selektionspuffer gespült. Jedes Volumen auf dem Filter wurde komplett abgesaugt, bevor das Nächste aufgetragen wurde. Nach Abschluss der Filtration wurde die Membran entnommen und durch quantitatives Phosphorimaging ausgewertet.

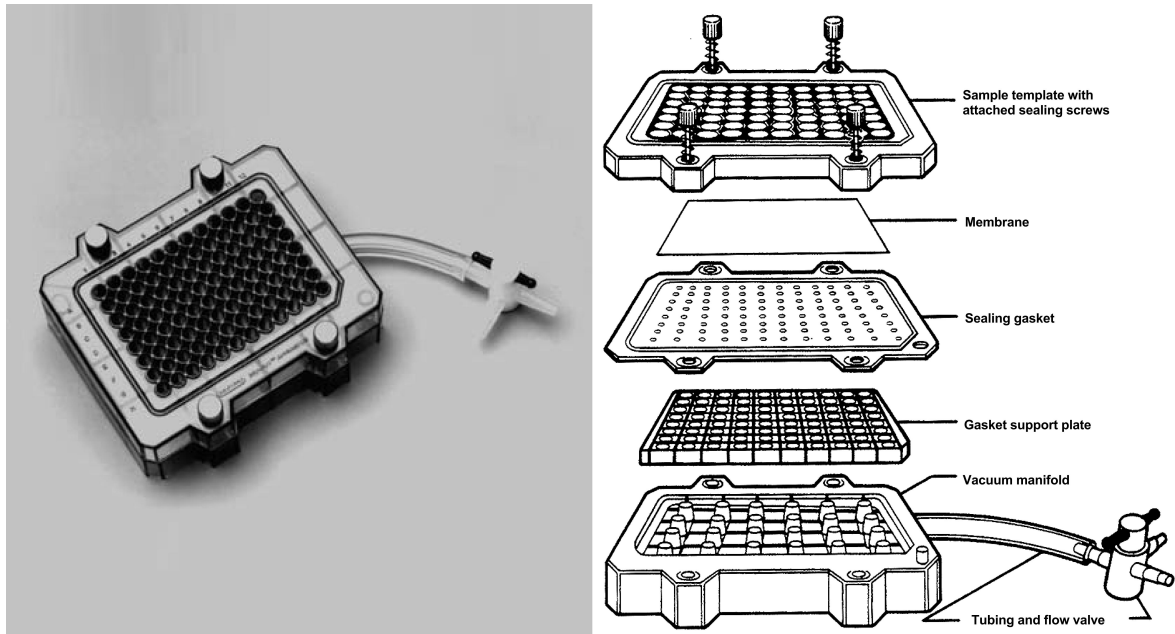


Abbildung 5.7 Bio-Dot® Microfiltration-Apparatur (BioRad).

Links. Aufsicht. **Rechts.** Explosionszeichnung: von oben nach unten: Deckel mit Schrauben zur Befestigung, Filtermembran (Nitrozellulose), Dichtungs-Gummimatte, Gitter zur Unterstützung der Dichtung, Auffanggefäß mit Ablauf und Dreiwegehahn. Entnommen aus ¹⁸⁸.

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

Abkürzungen	
% (v/v)	% (Volumen/Volumen)
% (w/v)	% (Gewicht/Volumen)
3'SS	3'-Spleißstelle
5'SS	5'-Spleißstelle
Ac	Acetat (Salz d. Essigsäure)
ACV	Aciclovir
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder-Serum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Classification Determinant
CDS	Proteinkodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
CMV	Cytomegalievirus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
ds	doppelsträngig
E. coli	Escherichia coli
<i>et al.</i>	et alii (lat.: "und andere")
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Fluorescence-Activated Cell Sorting)
f.c.	Finale Konzentration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fwd	vorwärts (<i>forward</i>)
GCV	Ganciclovir
gDNA	genomische DNA
HSV	Herpes Simplex Virus
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K _D	Dissoziationskonstante

Abkürzungen (<i>Fortsetzung</i>)	
LB	Nährmedium (<i>lysogeny broth</i>)
MCS	Multiple cloning site
Mio.	Millionen
MQ	Milli-Q®-Wasser
mRNA	messenger RNA
NLS	Kernlokalisations-Signal (<i>nuclear localisation sequence</i>)
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p.a.	pro analysis
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDNA	Plasmid-DNA
Phos	Phosphorylierung
P, Prom	Promotor
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
rel.	relativ
rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SELEX	Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
snRNA	kleine nukleäre RNA (<i>small nuclear RNA</i>)
ss	einzelsträngig
Tc	Tetracyclin
TK	Thymidinkinase
UTR	untranslatierter Bereich
Vol.	Volumen

6.2 Einheiten

Einheiten	
°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
Da	Dalton
g	Gravitationskraft oder Gramm
h	Stunde
l	Liter
M	molar
min	Minute
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
sec	Sekunde
U	Einheit (unit)
CPS	Zählimpulse / sec
V	Volt

6.3 Dimensionen

Vorsätze für Maßeinheiten	
k	kilo (10^3)
m	milli (10^{-3})
μ	micro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
p	pico (10^{-12})
f	femto (10^{-15})

6.4 Nucleobasen

Nukleobasen	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

6.5 Zusätzliche Abbildungen und Tabellen

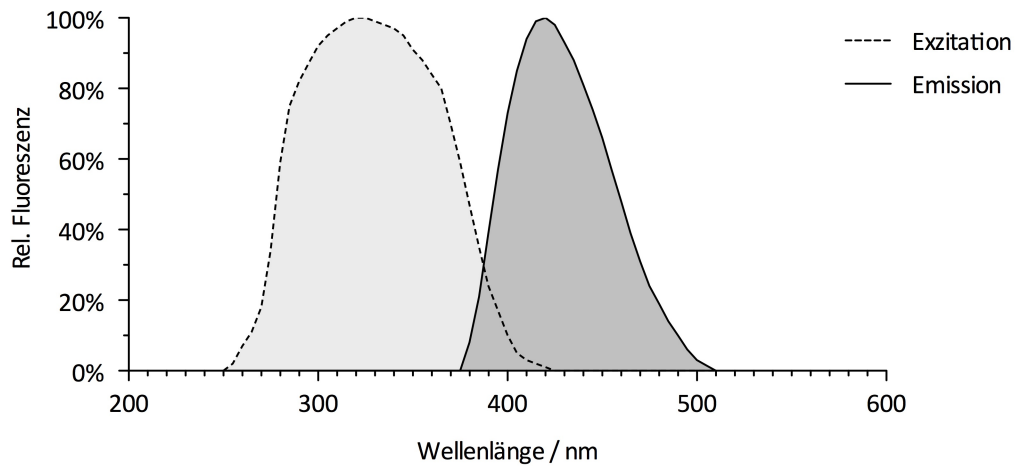


Abbildung 6.1 Emissions- und Exzitationsspektrum von Ciprofloxacin.

Dargestellt ist das Exzitationsspektrum (gepunktete Linie, hellgraue Fläche) und das Emissionsspektrum (durchgängige Linie, dunkelgraue Fläche) von CFX. Die maximale Exzitation liegt bei 320 nm, die maximale Emission bei 420 nm. Das Emissions- und Exzitations-Spektrum wurde am FluoroLog®-3 von HORIBA aufgenommen. Das Emissionsspektrum wurde mit folgenden Einstellungen aufgenommen: Anregung bei 320 nm, Spalt 5 nm, Aufnahme von 375 – 505 nm, Spalt 5nm, 0,5 s Integrationszeit. Das Exzitationsspektrum wurde mit folgenden Einstellungen aufgenommen: Aufnahme bei 420 nm, Spalt 5 nm, Anregung von 250 - 420 nm, Spalt 5nm, 0,5 s Integrationszeit. Aufgenommen wurden 2 ml 100 nM CFX in 1x PBS. Der Hintergrund (1x PBS) wurde von allen Daten subtrahiert, danach wurde der größte Wert jeden Spektrums jeweils auf 100% gesetzt.

Tabelle 6.1 Motive innerhalb des CFX-Pools Runde 7.

Klon	Sequenz (5'→3')
CFX_K1	ACCTCTCACCTAAAAATGCCTCCTCGTACCACCAGAAGATGTGC AGGAACG(((.(((.....))))))....
CFX_K2	AAATTCGCAATAATAGCTCCGCTGTGC AGGAACG GGGAGCACAGCTGCAT(((.....(((.(((.....))))))))).....))....
CFX_K3	ACCCAGAAGCACGTCTTGCTGCGCAGGAGCGGGAGGACAGAAGGCGGC((.(((.(((.....))))))))).....))....
CFX_K4	ATAACTGAATCGATATGGCAGTTGCTGCGCAGGAGCGGGACTACCGTAGG(((.(((.(((.....))))))))).....))....
CFX_K5	ACGCGCTGTGC AGGAACG GGCGTAGGGACGCTCCAATCACCAGGCCTCCT (((.(((.....))))))....(((.(((.....))))))....
CFX_K6	GCGCTGCTGTGC AGGAACG GGGCGCAACGGTTTATAAGCAAAGCCATACC (((.(((.....))))))....(((.....))).....
CFX_K7	CTATCTTTTATTCAAACCTGCTCCAAA AGGCAAG CGACTACCGTAGCCTT(((.(((.....))))))....
CFX_K8	TTGTTTCGGGCCATAGACTCTAAGGAAGCCGCTGTGC AGGAACG GGGCCTC(((.....(((.....)))....(((.....))))))....
CFX_K10	GATGTGC AGGAACG TAAGCGTGTAGTCATTCCGCCTATGGCAGCTAGTGG((.(((.....))).....))....(((.....))).....
CFX_K11	GCCGAGCTAAAAACCCCTCTATCAATCGTGCTGCGCAGGAGCGGGCGATT ...((.....))....(((.....(((.....))))))....
CFX_K12	CGTGATCATGGTTCCGG AGGGAAG ACCCCGTACGCAAGCCCACTACCTCC ..(((.....(((.(((.....))))....))....))).....
CFX_K14	GATTGACCCGATAAAAGACG AGGTATG GCGCGCAACAGCCTATCGGATCA ...(((.(((.....(((.....))))....)))....))....
CFX_K16	TGACAAGCGCATGCATCTGTGGCCTC AGGAAGC GCGGATGCGGTCCCA((.(((.....(((.....))))....))).....
CFX_K17	ACAGGGACTGCTGCGCAGGAGCGGGGTCTCTGTTCTAACGTCGTCTCATA (((.....(((.(((.....))))....)))....))....
CFX_K18	GACTCATGAATC AGATACG CTCCACGCCATCCACTCTACAACGACCCGCC(((.(((.....))))....))....
CFX_K19	AAGGCCCAAGAGCATATGCCTCCCTGTTGCGCAGGAGCGAGGGGGAGTG ...((.....))....(((.....(((.....))))....))....
CFX_K21	GAAAGTTTACAACCTAGACCGGCAGATCTGCAGGAAGGTTGCCGATAGCG(((.....)))....(((.....(((.....))))....))....
CFX_K22	ACCTCTCACCTAAGATGCCTCCTCGTACCACCAGAAGATGTGC AGGAACG(((.(((.....))))....))....
CFX_K23	CACAACTCAAACAGCCGTGATGTGC AGGAACG TGCGGCAAATAACCTC(((.....(((.....))))....))....

^a Gegeben sind die Sequenzen der randomisierten Kernbereiche in 5'→3'-Notation mit zugehöriger Sekundärstrukturvorhersage in Dot-Bracket-Notation. Die Sequenzähnlichkeiten wurden erstellt unter Verwendung von MEME, welches auf dieser Basis Motive definiert¹⁸⁹. Das Hauptmotiv G[CA]TG[TC]GCAGGA[AG]CG ist unterstrichen, das zweithäufigste Motiv AGG[ACTG]A[ACTG]G ist fett gedruckt. Oftmals überlagern sich beide Motive.

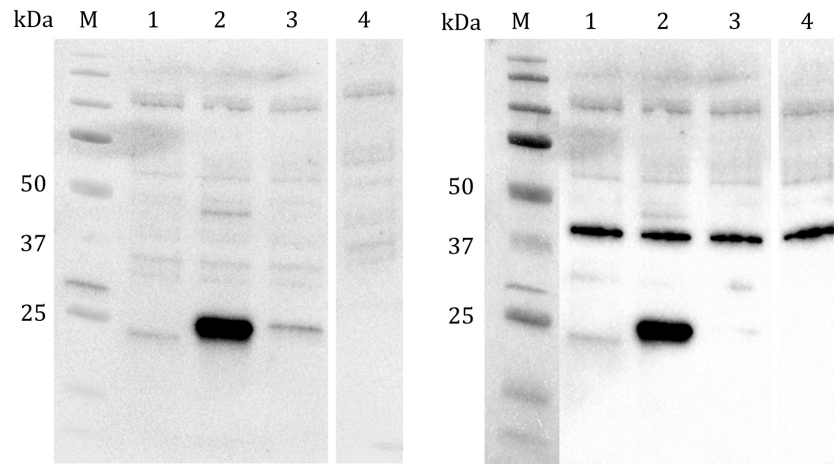


Abbildung 6.2 Nachweis von TetR und Actin im Zellkernextrakt von Hek-293-Zellen mittels Westernblot.

Der entwickelte WB TetR (links) und β -Actin (rechts) mit eingeleiteter Proteinleiter Precision Plus Protein All Blue (BioRad). Spur 1: pCMV_TetR, Spur 2: pCMV-NLS_TetR, Spur 3: pCMV_TetR-NLS, Spur 4: Mock-transfizierte Hek-293. Nach Inkubation und Entwicklung mit dem TetR-Antikörper wurde β -Actin entwickelt. Da es nicht notwendig war zwischen der Anwendung beider Antikörper die Membran zu löschen, erkennt man auf dem β -Actin-WB auch noch das Signal von TetR.

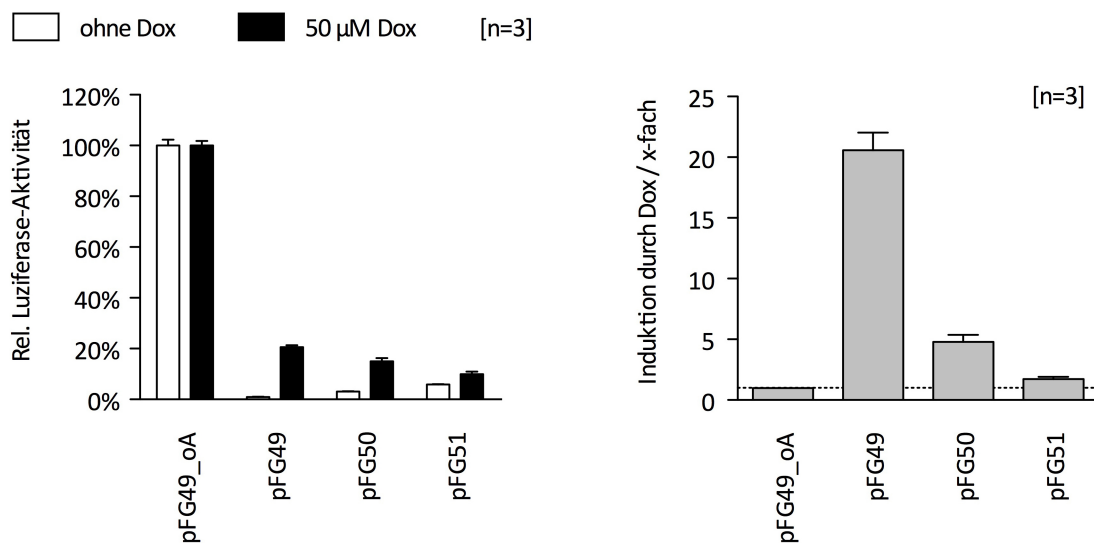


Abbildung 6.3 Übertragung des AN- und AUS-Schalters auf das β -Globin Intron 2.

Links: Relative Luciferase-Aktivität der angegebenen Konstrukte $\pm 50 \mu$ M Dox. **Rechts:** Davon abgeleitete Induktion durch Doxycyclin (Gepunktete Linie markiert den Wert 1, keine Regulation).

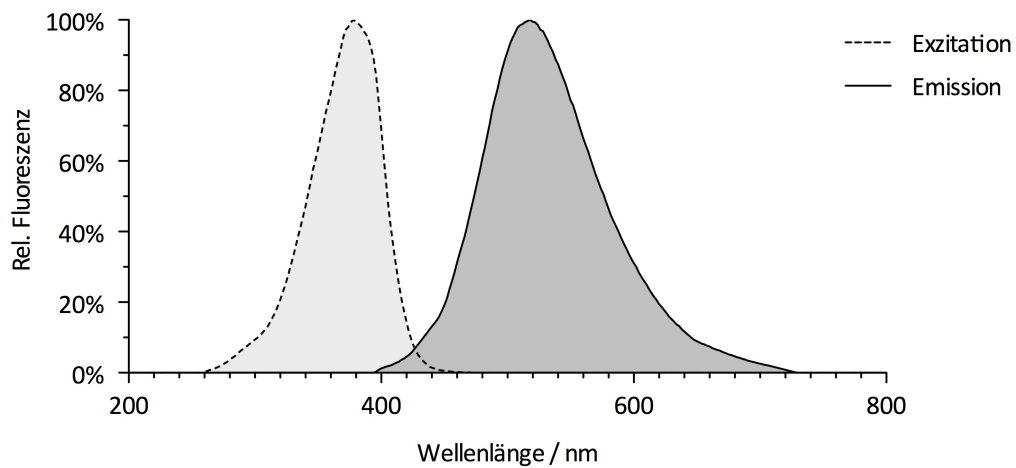


Abbildung 6.4 Emissions- und Exzitationsspektrum von Doxycyclin.

Dargestellt ist das Exzitationsspektrum (gepunktete Linie, hellgraue Fläche) und das Emissionsspektrum (durchgängige Linie, dunkelgraue Fläche) von Dox. Die maximale Exzitation liegt bei 378 nm, die maximale Emission bei 518 nm. Das Emissions- und Exzitations-Spektrum von Doxycyclin wurde am FluoroLog®-3 von HORIBA aufgenommen. Das Emissionsspektrum wurde mit folgenden Einstellungen aufgenommen: Anregung bei 380 nm, Slit 5 nm, Aufnahme von 390 – 700 nm, Slit 5nm, 0,5 s Integrationszeit. Das Exzitationsspektrum wurde mit folgenden Einstellungen aufgenommen: Aufnahme bei 515 nm, Slit 5 nm, Anregung von 200 - 600 nm, Slit 5nm, 0,5 s Integrationszeit. Aufgenommen wurden 2 ml 50 µM Dox in 1x PBS. Der Hintergrund (1x PBS) wurde von allen Daten subtrahiert, danach wurde der größte Wert jeden Spektrums jeweils auf 100% gesetzt.

Tabelle 6.2 Luziferase-Assay-Daten zu den angegebenen Plasmide (Intronpositionen).

Plasmid	Mittelwerte			Prozentuale Standardabweichung		
	ohne Dox	50 μ M Dox	Regulations-faktor	ohne Dox	50 μ M Dox	Regulations-faktor
pFG4	0,3%	2,8%	10,22	0,0%	0,3%	0,86
pFG5	104,2%	105,1%	1,01	2,0%	1,9%	0,02
pFG6	10,3%	26,5%	2,58	0,6%	3,4%	0,24
pFG7	69,4%	84,1%	1,21	5,0%	5,4%	0,05
pFG8	0,2%	3,6%	14,70	0,0%	0,2%	1,18
pFG9	79,4%	82,5%	1,04	0,8%	2,1%	0,02
pFG10	65,8%	69,9%	1,07	4,9%	2,0%	0,05
pFG11	42,6%	76,5%	1,79	1,6%	6,0%	0,07
pFG12	30,4%	68,8%	2,28	3,0%	2,5%	0,16
pFG13	34,1%	64,0%	1,88	2,5%	1,5%	0,10
pFG14	45,4%	59,0%	1,30	1,8%	2,7%	0,01
pFG15	19,9%	45,4%	2,28	1,6%	3,5%	0,07

Tabelle 6.3 Luziferase-Assay-Daten zu den verschiedenen TetR-Varianten.

Reporter-Plasmid	TetR-Plasmid	Mittelwerte			Prozentuale Standardabweichung		
		ohne Dox	50 μ M Dox	Reg.-Faktor	ohne Dox	50 μ M Dox	Reg.-Faktor
pFG2	pCMV_TetR	5%	19%	4,1	0,4%	0,7%	0,15
pFG2	pCMV_NLS_TetR	2%	19%	8,3	0,1%	1,9%	0,35
pFG2	pCMV_TetR_NLS	3%	15%	5,1	0,1%	0,8%	0,06
pFG2	kein TetR	18%	19%	1,1	1,6%	1,1%	0,07

Tabelle 6.4 Luziferase-Daten zu den unterschiedlichen Verhältnissen von pFG2 zu pCMV_NLS_TetR.

Verhältnis ^a	Mittelwerte			Prozentuale Standardabweichung		
	ohne Dox	50 μ M Dox	Regulations-faktor	ohne Dox	50 μ M Dox	Regulations-faktor
1 : 0,5	6,4%	20,1%	3,26	1,2%	1,7%	0,69
1 : 1	5,0%	23,3%	4,82	0,8%	0,8%	0,83
1 : 2	2,2%	18,7%	8,31	0,1%	1,9%	0,35
1 : 4	2,7%	28,8%	11,03	0,4%	0,8%	1,82
1 : 8	1,8%	22,3%	12,57	0,3%	2,8%	3,26

^a Relatives Verhältnis von Reporter-Plasmid pFG2 zu pCMV_NLS_TetR. Die Menge an pFG2 wurde konstant bei 50 ng/well gehalten, während die Menge an pCMV_NLS_TetR von 25 ng angehoben wurde bis auf 400 ng/well.

Tabelle 6.5 Luziferase-Assay-Daten zu den verschiedenen getesteten Zelllinien.

Zelllinie	Mittelwerte			Prozentuale Standardabweichung		
	ohne Dox	50 µM Dox	Regulationsfaktor	ohne Dox	50 µM Dox	Regulationsfaktor
Hek-293-Zellen	2,2%	18,7%	8,31	0,1%	1,9%	0,35
HeLa-Zellen	0,4%	9,1%	21,47	0,0%	0,9%	1,01
A549-Zellen	1,0%	9,0%	8,05	0,0%	2,0%	0,15

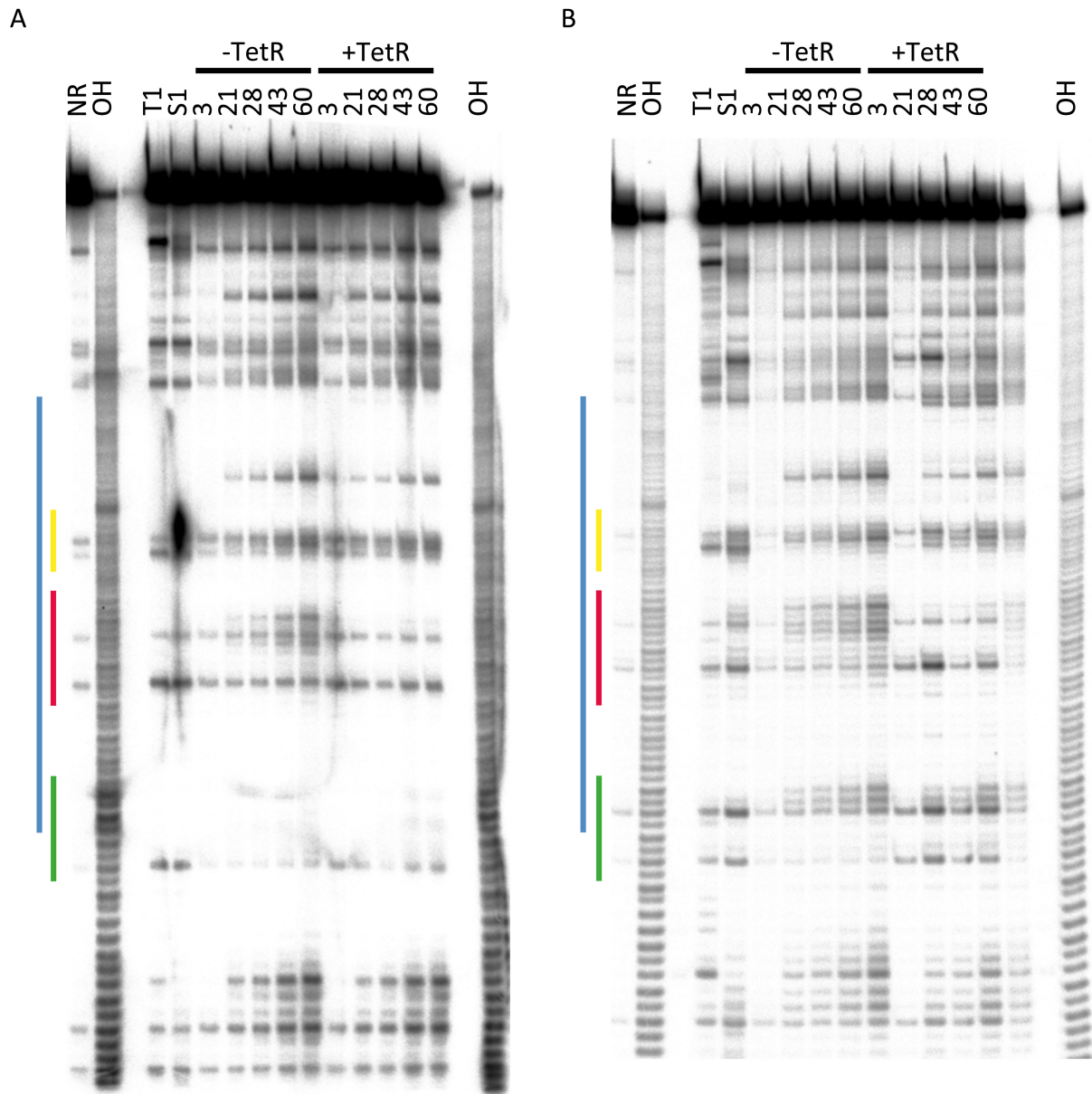


Abbildung 6.5 Vorläufige *In-line probing*-Daten der von den Konstrukten pFG2 und pFG22 abgeleiteten RNAs.

Vorbereitend zum *in-line probing*-Experiment wurde von pFG2 und pFG22 die Aptamerdomäne mit je 50 bp flankierenden Regionen und der T7-Promotor in das Plasmidrückgrat von pSP64 kloniert. Nach Linearisierung mit EcoRI und Phenolisierung wurde von beiden Plasmiden eine *run-off* Transkription gestartet. Die erhaltene RNA wurde aus einem 8% PAA-Gel (+8M Urea) ausgeschnitten und über Nacht in 300 mM NaAc pH 6,5 eluiert. Nach Fällung der RNA wurde diese dephosphoryliert und im Anschluss mit γ - 32 P-ATP phosphoryliert. Nach Faltung (snap cooling) der RNA wurde diese für das *in-line probing* eingesetzt. Der Ablauf des *in-line probing*-Experimentes ist bereits durch Hunsicker *et al.* beschrieben worden⁹⁰. In Abbildung 6.5 sind die *in-line probing*-Gele zur RNA von pFG2 (A) und pFG22 (B) abgebildet. Die unterschiedlichen Bereiche der RNA sind farblich markiert: Aptamer (blau), TetR-Bindestelle (rot), terminaler Loop des Aptamers (gelb), 5'SS (grün). Die *in-line probing*-Reaktion wurde nach verschiedenen Zeitpunkten gestoppt (3 h, 21 h, 28 h, 43 h, 60 h) und in An- und Abwesenheiten von TetR inkubiert (\pm TetR). NR = nicht reagierte RNA, OH = alkalische Leiter, T1 = RNA mit T1 RNase behandelt, S1 = RNA mit S1 Nuclease behandelt.

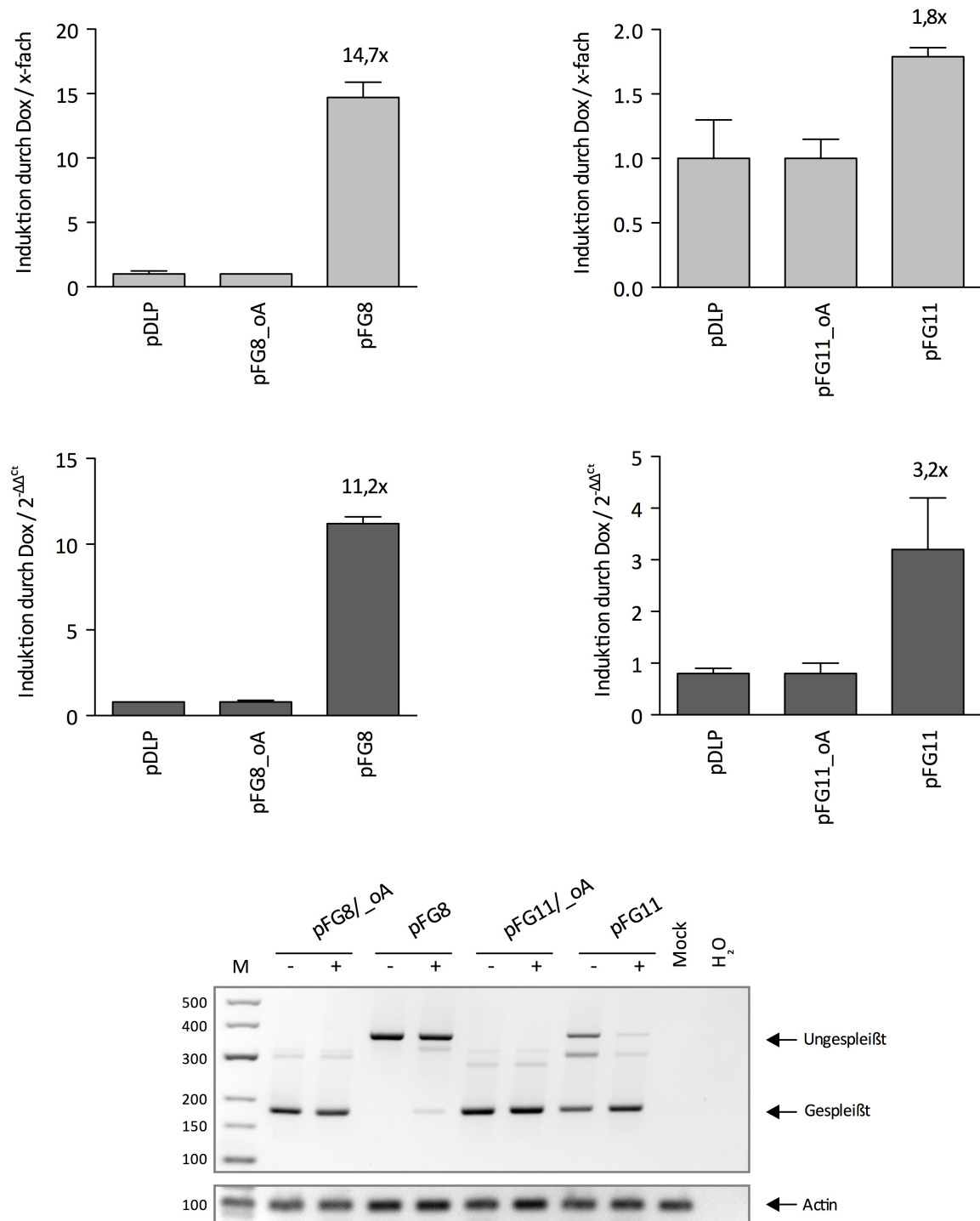


Abbildung 6.6 Äquivalenz zwischen Luziferase-Assay-Daten und (q)RT-PCR-Analysen.

Für die angegebenen Konstrukte sind die Induktionen durch 50 μ M Dox angegeben, die aus den Luziferase-Assays gewonnen wurden (oben), die Genexpression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert) gewonnen aus qRT-PCR-Experimenten und das entsprechende Spleißgel.

Tabelle 6.6 Einfluss des CI auf die Expression.

Position	Bezeichnung	Mittelwerte		SD%	
		ohne Dox	50 μ M Dox	ohne Dox	50 μ M Dox
-	pDLP	100%	100%	0,0	0,0
1	pDLP_CI	72%	70%	0,0	0,0
2	pFG4_oA	44%	42%	0,0	0,0
3	pFG5_oA	152%	161%	0,0	0,1
4	pFG6_oA	83%	82%	0,0	0,1
5	pFG7_oA	85%	87%	0,0	0,0
6	pFG8_oA	91%	89%	0,0	0,1
7	pFG9_oA	97%	93%	0,0	0,1
8	pFG10_oA	146%	146%	0,1	0,1
9	pFG11_oA	90%	89%	0,0	0,1
10	pFG12_oA	100%	100%	0,0	0,1
11	pFG13_oA	117%	115%	0,0	0,1
12	pFG14_oA	129%	129%	0,0	0,0
13	pFG15_oA	137%	137%	0,0	0,0

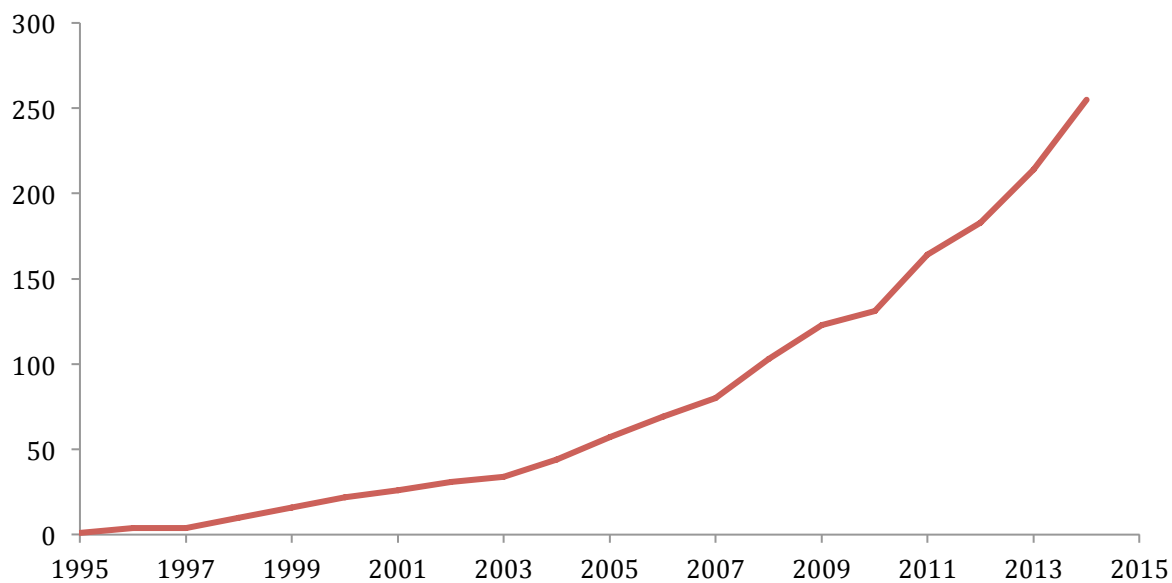


Abbildung 6.7 Pubmed-Einträge mit „intron retention“ im Titel oder Abstract. Abgerufen Januar 2015.

6.6 Sequenzen der verwendeten Introns

Alle Sequenzen sind in 5'→3'-Richtung notiert.

6.6.1 Chimäres Intron

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGCGTACGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGC GTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTA
CTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG

6.6.2 β-Globin Intron 2

GTGAGTCTATGGGACCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAA
ACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTGCTGTTTCATAACAATGTTTTCTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTT
TTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTATTATACTTAATGCCCTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACCTAAAAAAAAC
TTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACAT
AATCATTTATACATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTAAAAAATGCTTT
CTTCTTTTAAATATACTTTTTTGTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCAT
TCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAGAGGTTTCATAT
TGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGT
TCATACCTCTTATCTTCTCCACAG

6.6.3 ATF4 Intron 1

GTGAGTACCGGGGCGGGTCGTCCAGCTGTGCTCCTGGGGCCGGCGCGGGTTTTGGATTGGTGGGGTGC GGCTGGGGCCAGGGCGGTGCCGCCAAGGGGGAAG
CGATTTAACGAGCGCCCCGGGACGCGTGGTCTTTGCTTGGGTGTCCCCGAGACGCTCGCGTGCCTGGGATCGGGAAAGCGTAGTCGGGTGCCCGGACTGCTTCC
CCAGGAGCCCTACAGCCCTCGGACCCCGAGCCCCGCAAGGGTCCCAGGGGTCTTGGCTGTTGCCCCACGAAACGTGGCAGGAACCAAGATGGCGGGCGGCAGGG
CGGCGGCGCGGGCGTGAGTCAAGGGCGGGCGGTGGGCGGGGCGCGGCCGCCCTGGCCGTATTTGGACGTGGGGACGGAGCGCTTCCCTTTGGCGGCCGGTGG
AAGAATCCCCCTGGTCTCCGTGAGCGTCCATTTTGTGGAACCTGAGTTGCAAGCAGGGAGGGGCAAATACAACCTGCCCTGTTCCCGATTCTCTAGATGGCCGAT
CTAGAGAAGTCCCGCCTCATAAGTGAAGGATGAAATTCTCAGAACAGCTAACCTCTAATGGGAGTTGGCTTCTGATTCTCATTCAG

6.6.4 EIF1 Intron 1

GTAAGCTATGGGAAAGGTCGCGGGCCCGGGTGGGGCAGCGGGCCCTCCGGGCCCGGAGACGTGTTCCGGGAAGTTGCCAAGCGCTCCGGGCCCTTCGTAAGCT
CGGGCAGGGGAAACTTGACCAGGGTCGACAGGCAGCGGGATCAAGGCCTGGGCCCGGGGTGCGACCTGAGCGCGACCGGAAGGAGCAGGCGGTAGGTCAGC
CCTTGGGGCGGGCCCGCGCTCTCAGTGGCGCATTTACTAATGGCTCCTGGGCCCTCCTCGGGCCACACCCGCCCTCCCGTCACCATTTGCGTCACGTCCGTTACG
TCACCACCCGTGTGTCAGGATCCGGAGGGAAAGCGGGTGCCAGCCCTAAGTGGCAAGCGGGTGACCAATGGGGGTGGGAGGCTTAGCCCCGCCCTCGGGAGCT
CGGGTTCGCGCGGGTTGCATCAGCTGGGTGGGGCACCGCCTGGCAGCCCGGACTCCCCGACATGTGATCGGCTTCCAGGGAGGGCGGGAGGCCCGGGCGTT
CCCCGAGCCTGGGGAAGCTGGCCGTCCCGGACTGACCTGCTCGGGGAGAGCCAGCAAAGGACACATTGCGCCTGGCCCAAGCCCTGACGATTTAGTGTGTT
TTCTGCACGCGCAAAACACCTGGGGACCGAGGGGATGGCAGTGGCATCCTATCTTTGACAGCTCTGAACGAGCTTAACCTTTTTTTTTCAG

6.6.5 LBR Intron 9

GTATGCTCTGGTTTTTTTTTCTTCTAAATTTCAATTCAATAGGTCTAATTAAGTCTAGTAAAGAAATGTAGACCATTCAAAAATAAGCAGTGGGTGGTATATTTT
TAGGGATAAATTATGGCTTTCCATAAAATCTATCAAAATACTTTCTTGTAAAGTATTTTCCAGAGGTTTAAAGATGCCCTGTTACAGGTTATGACAAATTAATAAC
TTTTCTTTGCTTTATTTTTATTATATCAGTTTATTTATGTAGGAAAGTGATAGTGTGGATGAATTAATGTAAGAAAAAATGCATTTTCTCCTTTTTTAAAT
TTTACCTAGTTTTAGGCTTGAGTTGCAGATAGAGAGCAAAGAGTTCCCTTCCATCCTTCATTCTGTGTTTCTCACAACATTAACCTTGAGGAAACCGTAGTGT
AGTGATGAAGAACAGCAGATTAACATAGTGACAGCATTGGTTACCAAGTCCACAGGCCTCAGTCGAGTTTACCAGTTTTTCCGCTGTTGTCTTTTCTGTTT
CAGGAACCTCGACAGGACTCCACAATACATTTAGTTGTTATTCCCTTCTAGTCTTCTCTAGTCTAATAGTTGTTTAGGCTTTCTTGTCTCTCATGACCTTGA
TACTTTTTTGAAGGTACTGGTTGGTTATTTTGTAAAGTGTCCCTCAGTTTGGGTCATTCCAGTGTCTCTTTGATTGCGGTAAGTTATCCCACTGTGACAGGAA
CACAGAAATGATAGCTGTGCTCTTCTCAGTGCAATTGGGTCCAGGGGCCATGGTGCTGAGATGTCTTATTCCTGGTGGCGGGTAGGAGTTACGGTGGCGTCTG
CCAGGTGTCTCAGCTGTGAAGCTCACTCATGCCTTTGTAGTGCTAAGGTCTCTGGGGAGGTGCTTTGAGGCTATATACTTTCCCTTTTTGTTTCAG

7 Literaturverzeichnis

1. Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561–563 (1970).
2. Gilbert, W. Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**, 618–618 (1986).
3. Will, C. L. & Lührmann, R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, (2011).
4. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
5. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
6. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 522–531 (2004).
7. Bratkovič, T. & Rogelj, B. The many faces of small nucleolar RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**, 438–443 (2014).
8. Storz, G., Vogel, J. & Wassarman, K. M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. *Mol. Cell* **43**, 880–891 (2011).
9. Mandal, M. & Breaker, R. R. Gene regulation by riboswitches. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 451–463 (2004).
10. Barrick, J. E. & Breaker, R. R. The distributions, mechanisms, and structures of metabolite-binding riboswitches. *Genome Biol.* **8**, R239 (2007).
11. Li, S. & Breaker, R. R. Eukaryotic TPP riboswitch regulation of alternative splicing involving long-distance base pairing. *Nucleic Acids Res.* **41**, 3022–3031 (2013).
12. Breaker, R. R. Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
13. Garst, A. D., Edwards, A. L. & Batey, R. T. Riboswitches: structures and mechanisms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, (2011).
14. Edwards, T. E., Klein, D. J. & Ferré-D'Amaré, A. R. Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 273–279 (2007).
15. Feigon, J., Dieckmann, T. & Smith, F. W. Aptamer structures from A to zeta. *Chemistry & Biology* **3**, 611–617 (1996).
16. Tuerk, C. *et al.* CUUCGG hairpins: extraordinarily stable RNA secondary structures associated with various biochemical processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 1364–1368 (1988).
17. Batey, R., Rambo, R. & Doudna, J. Tertiary Motifs in RNA Structure and Folding. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **38**, 2326–2343 (1999).
18. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B. & Steitz, T. A. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905–920 (2000).
19. Shiman, R. & Draper, D. E. Stabilization of RNA tertiary structure by monovalent cations. *J. Mol. Biol.* **302**, 79–91 (2000).
20. Demolli, S. *et al.* Development of β -lactamase as a tool for monitoring conditional gene expression by a tetracycline-riboswitch in *Methanosarcina acetivorans*. *Archaea* **2014**, 725610 (2014).
21. Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A. & Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**, 1425–1429 (1994).
22. Desai, S. K. & Gallivan, J. P. Genetic screens and selections for small molecules based on a synthetic riboswitch that activates protein translation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13247–13254 (2004).

23. Topp, S. & Gallivan, J. P. Guiding bacteria with small molecules and RNA. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6807–6811 (2007).
24. Nakahira, Y., Ogawa, A., Asano, H., Oyama, T. & Tozawa, Y. Theophylline-dependent riboswitch as a novel genetic tool for strict regulation of protein expression in *Cyanobacterium Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1724–1735 (2013).
25. Suess, B., Fink, B., Berens, C., Stentz, R. & Hillen, W. A theophylline responsive riboswitch based on helix slipping controls gene expression in vivo. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1610–1614 (2004).
26. Rudolph, M. M., Vockenhuber, M.-P. & Suess, B. Synthetic riboswitches for the conditional control of gene expression in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology (Reading, Engl.)* **159**, 1416–1422 (2013).
27. Seeliger, J. C. *et al.* A Riboswitch-Based Inducible Gene Expression System for Mycobacteria. *PLoS ONE* **7**, e29266 (2012).
28. Reynoso, C. M. K., Miller, M. A., Bina, J. E., Gallivan, J. P. & Weiss, D. S. Riboswitches for intracellular study of genes involved in *Francisella* pathogenesis. *MBio* **3**, (2012).
29. Wachsmuth, M., Findeiß, S., Weissheimer, N., Stadler, P. F. & Mörl, M. De novo design of a synthetic riboswitch that regulates transcription termination. *Nucleic Acids Res.* **41**, 2541–2551 (2013).
30. Isaacs, F. J. *et al.* Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat Biotechnol* **22**, 841–847 (2004).
31. Friedland, A. E. *et al.* Synthetic gene networks that count. *Science* **324**, 1199–1202 (2009).
32. Callura, J. M., Dwyer, D. J., Isaacs, F. J., Cantor, C. R. & Collins, J. J. Tracking, tuning, and terminating microbial physiology using synthetic riboregulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 15898–15903 (2010).
33. Dawid, A., Cayrol, B. & Isambert, H. RNA synthetic biology inspired from bacteria: construction of transcription attenuators under antisense regulation. *Phys Biol* **6**, 025007 (2009).
34. Lucks, J. B., Qi, L., Mutalik, V. K., Wang, D. & Arkin, A. P. Versatile RNA-sensing transcriptional regulators for engineering genetic networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 8617–8622 (2011).
35. Qi, L., Lucks, J. B., Liu, C. C., Mutalik, V. K. & Arkin, A. P. Engineering naturally occurring trans-acting non-coding RNAs to sense molecular signals. *Nucleic Acids Res.* **40**, 5775–5786 (2012).
36. Werstuck, G. & Green, M. R. Controlling gene expression in living cells through small molecule-RNA interactions. *Science* **282**, 296–298 (1998).
37. Grate, D. & Wilson, C. Inducible regulation of the *S. cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA aptamer-ligand complex. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 2565–2570 (2001).
38. Berens, C., Thain, A. & Schroeder, R. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 2549–2556 (2001).
39. Suess, B. *et al.* Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1853–1858 (2003).
40. Hanson, S., Berthelot, K., Fink, B., McCarthy, J. E. G. & Suess, B. Tetracycline-aptamer-mediated translational regulation in yeast. *Mol. Microbiol.* **49**, 1627–1637 (2003).
41. Kotter, P., Weigand, J. E., Meyer, B., Entian, K. D. & Suess, B. A fast and efficient translational control system for conditional expression of yeast genes. *Nucleic Acids Res.* **37**, e120–e120 (2009).
42. Weigand, J. E. *et al.* Screening for engineered neomycin riboswitches that control translation initiation. *RNA* **14**, 89–97 (2008).

43. Wilson, C., Nix, J. & Szostak, J. Functional requirements for specific ligand recognition by a biotin-binding RNA pseudoknot. *Biochemistry* **37**, 14410–14419 (1998).
44. Harvey, I., Garneau, P. & Pelletier, J. Inhibition of translation by RNA-small molecule interactions. *RNA* **8**, 452–463 (2002).
45. Kozak, M. Influence of mRNA secondary structure on binding and migration of 40S ribosomal subunits. *Cell* **19**, 79–90 (1980).
46. Oliveira, C. C., Heuvel, J. J. & McCarthy, J. E. Inhibition of translational initiation in *Saccharomyces cerevisiae* by secondary structure: the roles of the stability and position of stem-loops in the mRNA leader. *Mol. Microbiol.* **9**, 521–532 (1993).
47. Vega Laso, M. R. *et al.* Inhibition of translational initiation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a function of the stability and position of hairpin structures in the mRNA leader. *J. Biol. Chem.* **268**, 6453–6462 (1993).
48. Tang, J. & Breaker, R. R. Rational design of allosteric ribozymes. *Chemistry & Biology* **4**, 453–459 (1997).
49. Winkler, W. C., Nahvi, A., Roth, A., Collins, J. A. & Breaker, R. R. Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme. *Nature* **428**, 281–286 (2004).
50. Soukup, G. A. & Breaker, R. R. Engineering precision RNA molecular switches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 3584–3589 (1999).
51. Khvorova, A., Lescoute, A., Westhof, E. & Jayasena, S. D. Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 708–712 (2003).
52. Martick, M. & Scott, W. G. Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell* **126**, 309–320 (2006).
53. Yen, L. *et al.* Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature* **431**, 471–476 (2004).
54. Wieland, M. & Hartig, J. S. Improved aptazyme design and in vivo screening enable riboswitching in bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47**, 2604–2607 (2008).
55. Link, K. H. *et al.* Engineering high-speed allosteric hammerhead ribozymes. *Biol. Chem.* **388**, 779–786 (2007).
56. Wittmann, A. & Suess, B. Selection of tetracycline inducible self-cleaving ribozymes as synthetic devices for gene regulation in yeast. *Mol Biosyst* **7**, 2419–2427 (2011).
57. Beilstein, K., Wittmann, A., Grez, M. & Suess, B. Conditional Control of Mammalian Gene Expression by Tetracycline-Dependent Hammerhead Ribozymes. *ACS Synth. Biol.* (2014). doi:10.1021/sb500270h
58. Berschneider, B., Wieland, M., Rubini, M. & Hartig, J. S. Small-molecule-dependent regulation of transfer RNA in bacteria. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 7564–7567 (2009).
59. Wieland, M., Berschneider, B., Erlacher, M. D. & Hartig, J. S. Aptazyme-mediated regulation of 16S ribosomal RNA. *Chemistry & Biology* **17**, 236–242 (2010).
60. Kumar, D., An, C.-I. & Yokobayashi, Y. Conditional RNA interference mediated by allosteric ribozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13906–13907 (2009).
61. Beisel, C. L., Bayer, T. S., Hoff, K. G. & Smolke, C. D. Model-guided design of ligand-regulated RNAi for programmable control of gene expression. *Mol. Syst. Biol.* **4**, 224 (2008).
62. Kim, D.-S., Gusti, V., Pillai, S. G. & Gaur, R. K. An artificial riboswitch for controlling pre-mRNA splicing. *RNA* **11**, 1667–1677 (2005).
63. Kim, D.-S., Gusti, V., Dery, K. J. & Gaur, R. K. Ligand-induced sequestering of branchpoint sequence allows

- conditional control of splicing. *BMC Mol. Biol.* **9**, 23 (2008).
64. Weigand, J. E. & Suess, B. Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4179–4185 (2007).
 65. Müller, M., Weigand, J. E., Weichenrieder, O. & Suess, B. Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2607–2617 (2006).
 66. Culler, S. J., Hoff, K. G. & Smolke, C. D. Reprogramming cellular behavior with RNA controllers responsive to endogenous proteins. *Science* **330**, 1251–1255 (2010).
 67. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510 (1990).
 68. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
 69. McKeague, M. & DeRosa, M. C. Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *Journal of Nucleic Acids* **2012**, 1–20 (2012).
 70. Vater, A. & Klussmann, S. Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer(®) therapeutics. *Drug Discov. Today* (2014). doi:10.1016/j.drudis.2014.09.004
 71. White, R. *et al.* Generation of species cross-reactive aptamers using 'toggle' SELEX. *Mol. Ther.* **4**, 567–573 (2001).
 72. Groher, F. & Suess, B. Synthetic riboswitches - A tool comes of age. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**, 964–973 (2014).
 73. Duchardt-Ferner, E. *et al.* Highly modular structure and ligand binding by conformational capture in a minimalistic riboswitch. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 6216–6219 (2010).
 74. Xiao, H., Edwards, T. E. & Ferré-D'Amaré, A. R. Structural basis for specific, high-affinity tetracycline binding by an in vitro evolved aptamer and artificial riboswitch. *Chemistry & Biology* **15**, 1125–1137 (2008).
 75. Zimmermann, G. R., Jenison, R. D., Wick, C. L., Simorre, J.-P. & Pardi, A. Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA. *Nature Structural & Molecular Biology* **4**, 644–649 (1997).
 76. Baugh, C., Grate, D. & Wilson, C. 2.8 Å crystal structure of the malachite green aptamer. *J. Mol. Biol.* **301**, 117–128 (2000).
 77. Ren, A., Rajashankar, K. R. & Patel, D. J. Fluoride ion encapsulation by Mg²⁺ ions and phosphates in a fluoride riboswitch. *Nature* **486**, 85–89 (2012).
 78. Azéma, J. *et al.* 7-((4-Substituted)piperazin-1-yl) derivatives of ciprofloxacin: synthesis and in vitro biological evaluation as potential antitumor agents. *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 5396–5407 (2009).
 79. Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M. & Roth, H. J. Medizinische Chemie. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart* (2010).
 80. Pfizer. Material Safety Data Sheet - Ciprofloxacin. (2009)
http://www.pfizer.com/files/products/material_safety_data/PZ01031.pdf
 81. Yu, X., Zipp, G. L. & Davidson, G. W. The effect of temperature and pH on the solubility of quinolone compounds: estimation of heat of fusion. *Pharm. Res.* **11**, 522–527 (1994).
 82. Vilfan, I. D., Drevensek, P., Turel, I. & Poklar Ulrih, N. Characterization of ciprofloxacin binding to the linear single- and double-stranded DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1628**, 111–122 (2003).
 83. Berens, C. & Hillen, W. Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur. J. Biochem.* **270**, 3109–3121 (2003).

84. Nikaido, H. & Thanassi, D. G. Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 1393–1399 (1993).
85. Sigler, A., Schubert, P., Hillen, W. & Niederweis, M. Permeation of tetracyclines through membranes of liposomes and *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **267**, 527–534 (2000).
86. Clontech. Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems - User Manual
87. Sadowski, I., Ma, J., Triezenberg, S. & Ptashne, M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**, 563–564 (1988).
88. Urlinger, S. *et al.* Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7963–7968 (2000).
89. Resch, M. *et al.* A protein functional leap: how a single mutation reverses the function of the transcription regulator TetR. *Nucleic Acids Res.* **36**, 4390–4401 (2008).
90. Hunsicker, A. *et al.* An RNA aptamer that induces transcription. *Chemistry & Biology* **16**, 173–180 (2009).
91. Steber, M., Arora, A., Hofmann, J., Brutschy, B. & Suess, B. Mechanistic basis for RNA aptamer-based induction of TetR. *ChemBioChem* **12**, 2608–2614 (2011).
92. Goldfless, S. J., Belmont, B. J., de Paz, A. M., Liu, J. F. & Niles, J. C. Direct and specific chemical control of eukaryotic translation with a synthetic RNA-protein interaction. *Nucleic Acids Res.* **40**, e64 (2012).
93. Belmont, B. J. & Niles, J. C. Engineering a direct and inducible protein-RNA interaction to regulate RNA biology. *ACS Chem. Biol.* **5**, 851–861 (2010).
94. Ausländer, D., Wieland, M., Ausländer, S., Tigges, M. & Fussenegger, M. Rational design of a small molecule-responsive intramer controlling transgene expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **39**, e155 (2011).
95. Moore, M. J., Query, C. C. & Sharp, P. A. in *Cold Spring Harbor ...* (Cold Spring Harbor Monograph Archive, 1993). at <<http://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/viewArticle/3798>>
96. De Conti, L., Baralle, M. & Buratti, E. Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 49–60 (2013).
97. Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J. & Blencowe, B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* **40**, 1413–1415 (2008).
98. Kelemen, O. *et al.* Function of alternative splicing. *Gene* **514**, 1–30 (2013).
99. Matlin, A. J., Clark, F. & Smith, C. W. J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 386–398 (2005).
100. Gooding, C. *et al.* A class of human exons with predicted distant branch points revealed by analysis of AG dinucleotide exclusion zones. *Genome Biol.* **7**, R1 (2006).
101. Buratti, E. & Baralle, F. E. Influence of RNA Secondary Structure on the Pre-mRNA Splicing Process. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 10505–10514 (2004).
102. Blencowe, B. J. Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**, 37–47 (2006).
103. Stoss, O. *et al.* Misregulation of pre-mRNA splicing that causes human diseases. Concepts and therapeutic strategies. *Gene Therapy Mol. Biol* **5**, 9–30 (2000).
104. Singh, R. K. & Cooper, T. A. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med* **18**, 472–482 (2012).
105. PUCK, T. T., MARCUS, P. I. & CIECIURA, S. J. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J. Exp. Med.* **103**, 273–283 (1956).
106. Invitrogen. *Dynabeads® M-280 Streptavidin* (Handbuch, 2011).

107. Zuker, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3406–3415 (2003).
108. Holmberg, A. *et al.* The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **26**, 501–510 (2005).
109. Chemistry, I. U. O. P. A. A. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*. (2003). doi:10.1351/goldbook
110. Gottstein-Schmidtke, S. R. *et al.* Building a stable RNA U-turn with a protonated cytidine. *RNA* **20**, 1163–1172 (2014).
111. Bothwell, A. L. *et al.* Heavy chain variable region contribution to the NPb family of antibodies: somatic mutation evident in a gamma 2a variable region. *Cell* **24**, 625–637 (1981).
112. Senapathy, P., Shapiro, M. B. & Harris, N. L. in *Methods in Enzymology* **Volume 183**, 252–278 (Academic Press, 1990).
113. Promega. siCHECK(tm) Vectors - Technical Bulletin TB329. (2009).
114. Li, X. *et al.* Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J. Biol. Chem.* **273**, 34970–34975 (1998).
115. Kemmerer, K. & Weigand, J. E. Hypoxia reduces MAX expression in endothelial cells by unproductive splicing. *FEBS Lett.* **588**, 4784–4790 (2014).
116. *Dissertation Janina Langner, TU Darmstadt.* (2013).
117. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
118. Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. & Hinrichs, W. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 215–219 (2000).
119. Lange, A. *et al.* Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* **282**, 5101–5105 (2007).
120. Kosugi, S. *et al.* Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J. Biol. Chem.* **284**, 478–485 (2009).
121. Fowler, C. C., Brown, E. D. & Li, Y. A FACS-based approach to engineering artificial riboswitches. *ChemBioChem* **9**, 1906–1911 (2008).
122. Ast, G. How did alternative splicing evolve? *Nat. Rev. Genet.* **5**, 773–782 (2004).
123. Zuker, M. & Stiegler, P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**, 133–148 (1981).
124. Hofacker, I. L. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3429–3431 (2003).
125. Wong, J. J.-L. *et al.* Orchestrated intron retention regulates normal granulocyte differentiation. *Cell* **154**, 583–595 (2013).
126. Amberger, J., Bocchini, C. & Hamosh, A. A new face and new challenges for Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®). *Hum. Mutat.* **32**, 564–567 (2011).
127. Black, M. E., Kokoris, M. S. & Sabo, P. Herpes simplex virus-1 thymidine kinase mutants created by semi-random sequence mutagenesis improve prodrug-mediated tumor cell killing. *Cancer Res.* **61**, 3022–3026 (2001).
128. Cragg, M. S., Walshe, C. A., Ivanov, A. O. & Glennie, M. J. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr. Dir. Autoimmun.* **8**, 140–174 (2005).
129. Golay, J. *et al.* CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic

- lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* **98**, 3383–3389 (2001).
130. Reardon, J. E. Herpes simplex virus type 1 and human DNA polymerase interactions with 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate analogues. Kinetics of incorporation into DNA and induction of inhibition. *J. Biol. Chem.* **264**, 19039–19044 (1989).
 131. National Center for Biotechnology Information. Ganciclovir - PubChem-CID 3454.
 132. National Center for Biotechnology Information. Acyclovir - PubChem-CID 2022.
 133. Invitrogen. pcDNA(tm)5/FRT Vector - User Guide. *tools.lifetechnologies.com* (2012). at <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/flpin_pcdna5frt_man.pdf>
 134. Tsai, P.-C., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Bangia, N., Olejniczak, S. H. & Czuczman, M. S. Regulation of CD20 in rituximab-resistant cell lines and B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1039–1050 (2012).
 135. Riccardi, C. & Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* **1**, 1458–1461 (2006).
 136. <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01304.pdf>.
 137. Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & Riccardi, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271–279 (1991).
 138. Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T. & Takata, K. DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 49–53 (1997).
 139. Dieckmann, T., Butcher, S. E., Sassanfar, M., Szostak, J. W. & Feigon, J. Mutant ATP-binding RNA aptamers reveal the structural basis for ligand binding. *J. Mol. Biol.* **273**, 467–478 (1997).
 140. Stampfl, S., Lempradl, A., Koehler, G. & Schroeder, R. Monovalent ion dependence of neomycin B binding to an RNA aptamer characterized by spectroscopic methods. *ChemBioChem* **8**, 1137–1145 (2007).
 141. Berens, C. & Suess, B. Riboswitch engineering - making the all-important second and third steps. *Curr. Opin. Biotechnol.* **31C**, 10–15 (2015).
 142. ChemSpider. at <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.1906.html>>
 143. Bitsch, R., Salz, I. & Hötzel, D. Studies on bioavailability of oral biotin doses for humans. *Int J Vitam Nutr Res* **59**, 65–71 (1989).
 144. Mock, D. M. & Lankford, G. Studies of the reversible binding of biotin to human plasma. *J. Nutr.* **120**, 375–381 (1990).
 145. Flinders, J. *et al.* Recognition of planar and nonplanar ligands in the malachite green-RNA aptamer complex. *ChemBioChem* **5**, 62–72 (2004).
 146. Wallis, M. G., Ahsen, von, U., Schroeder, R. & Famulok, M. A novel RNA motif for neomycin recognition. *Chemistry & Biology* **2**, 543–552 (1995).
 147. Ross, D. L. Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. *International Journal of Pharmaceutics* (1990).
 148. Volpe, D. A. Permeability classification of representative fluoroquinolones by a cell culture method. *AAPS PharmSci* **6**, 1 (2004).
 149. Ong, H. X., Traini, D., Bebawy, M. & Young, P. M. Ciprofloxacin is actively transported across bronchial lung epithelial cells using a Calu-3 air interface cell model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 2535–2540 (2013).

150. Niazi, J. H., Lee, S. J. & Gu, M. B. Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 7245–7253 (2008).
151. Mann, D., Reinemann, C., Stoltenburg, R. & Strehlitz, B. In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1928–1934 (2005).
152. Wochner, A. *et al.* A DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *Anal. Biochem.* **373**, 34–42 (2008).
153. Song, K.-M., Jeong, E., Jeon, W., Cho, M. & Ban, C. Aptasensor for ampicillin using gold nanoparticle based dual fluorescence-colorimetric methods. *Anal Bioanal Chem* **402**, 2153–2161 (2012).
154. Stovall, G. M., Cox, J. C. & Ellington, A. D. Automated Optimization of Aptamer Selection Buffer Conditions. *The Association for Laboratory Automation* at <<http://jla.sagepub.com/content/9/3/117.full.pdf>>
155. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P. & Kaiser, C. A. *Molecular Cell Biology 5th Edition*. (W H Freeman & Company, 2004).
156. Carothers, J. M., Goler, J. A., Kapoor, Y., Lara, L. & Keasling, J. D. Selecting RNA aptamers for synthetic biology: investigating magnesium dependence and predicting binding affinity. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2736–2747 (2010).
157. Bing, T., Yang, X., Mei, H., Cao, Z. & Shangguan, D. Conservative secondary structure motif of streptavidin-binding aptamers generated by different laboratories. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 1798–1805 (2010).
158. Hiller, M., Pudimat, R., Busch, A. & Backofen, R. Using RNA secondary structures to guide sequence motif finding towards single-stranded regions. *Nucleic Acids Res.* **34**, e117 (2006).
159. Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J. & Salemme, F. R. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **243**, 85–88 (1989).
160. Meyer, C. *et al.* Interleukin-6 receptor specific RNA aptamers for cargo delivery into target cells. *RNA Biology* **9**, 67–80 (2012).
161. Stoltenburg, R., Reinemann, C. & Strehlitz, B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* **383**, 83–91 (2005).
162. *Dual-Glo® Luciferase Assay System - TECHNICAL MANUAL* (Promega).
163. Loetscher, P., Pratt, G. & Rechsteiner, M. The C terminus of mouse ornithine decarboxylase confers rapid degradation on dihydrofolate reductase. Support for the pest hypothesis. *J. Biol. Chem.* **266**, 11213–11220 (1991).
164. Nott, A., Meislin, S. H. & Moore, M. J. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA* **9**, 607–617 (2003).
165. Dang, C. V. & Lee, W. M. Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 4048–4054 (1988).
166. Ogawa, A. Ligand-dependent upregulation of ribosomal shunting. *ChemBioChem* **14**, 1539–43– 1509 (2013).
167. Lynch, S. A., Desai, S. K., Sajja, H. K. & Gallivan, J. P. A High-Throughput Screen for Synthetic Riboswitches Reveals Mechanistic Insights into Their Function. *Chemistry & Biology* **14**, 173–184 (2007).
168. Rossi, F. *et al.* Involvement of U1 small nuclear ribonucleoproteins (snRNP) in 5' splice site-U1 snRNP interaction. *J. Biol. Chem.* **271**, 23985–23991 (1996).
169. Yin, D. X., Zhu, L. & Schimke, R. T. Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. *Anal. Biochem.* **235**, 195–201 (1996).
170. Mishler, D. M. & Gallivan, J. P. A family of synthetic riboswitches adopts a kinetic trapping mechanism. *Nucleic*

Acids Res. **42**, 6753–6761 (2014).

171. Chen, Y. Y., Jensen, M. C. & Smolke, C. D. Genetic control of mammalian T-cell proliferation with synthetic RNA regulatory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 8531–8536 (2010).
172. Müller, T. *et al.* Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **57**, 411–423 (2008).
173. Maueröder, C., Chaurio, R. A., Platzer, S., Muñoz, L. E. & Berens, C. Model systems for rapid and slow induction of apoptosis obtained by inducible expression of pro-apoptotic proteins. *Autoimmunity* **46**, 329–335 (2013).
174. Antoniou, M., Geraghty, F., Hurst, J. & Grosveld, F. Efficient 3'-end formation of human beta-globin mRNA in vivo requires sequences within the last intron but occurs independently of the splicing reaction. *Nucleic Acids Res.* **26**, 721–729 (1998).
175. Martins, S. B. *et al.* Spliceosome assembly is coupled to RNA polymerase II dynamics at the 3' end of human genes. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 1115–1123 (2011).
176. ROCA, X., SACHIDANANDAM, R. & Krainer, A. R. Determinants of the inherent strength of human 5' splice sites. *RNA* **11**, 683–698 (2005).
177. Kent, W. J. *et al.* The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* **12**, 996–1006 (2002).
178. Thierry-Mieg, D. & Thierry-Mieg, J. AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation. *Genome Biol.* **7 Suppl 1**, S12.1–14 (2006).
179. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning*. (CSHL Press, 2001).
180. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580 (1983).
181. van Kuppeveld, F. J. *et al.* Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 149–152 (1994).
182. Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7413–7417 (1987).
183. Higuchi, B. K. R. K. S. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **16**, 7351 (1988).
184. Chu, H.-S. *et al.* A new cloning strategy for generating multiple repeats of a repetitive polypeptide based on non-template PCR. *Biotechnol. Lett.* **33**, 977–983 (2011).
185. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
186. Beer. in *Annalen der Physik und Chemie*
187. Thermo Extinction Coefficients: <http://www.piercenet.com/files/TR0006-Extinction-coefficients.pdf>
188. BioRad. *Bio-Dot® Microfiltration Apparatus - Instruction Manual*.
189. Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C. & Li, W. W. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* **34**, W369–73 (2006).

8 Curriculum Vitae

Name **Florian Groher**

geboren am 16.10.1984 in Aschaffenburg, Deutschland

Adresse Grüner Weg 20, 64285 Darmstadt, Deutschland

Schul Ausbildung

1992 – 1995 **Walinus Grundschule, Klein-Welzheim, Deutschland**

1995 – 2004 **Franziskaner Gymnasium, Groß-Krotzenburg, Deutschland**

Abschluss: Abitur

Zivildienst

2004 – 2005 **Seniorenpflegeheim Aurelius-Hof, Mainhausen-Mainflingen, Deutschland**

Hochschulausbildung

2005 – 2011 **Biologie-Studium an der Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Deutschland**

Vertiefung in Genetik, Zellbiologie, Biochemie und pharmazeutische Biologie

Titel der Diplomarbeit: Regulation der Genexpression der 5-Lipoxygenase

Abschluss: Diplom-Biologe (mit Auszeichnung)

Seit 2012 **Promotionsstudium an der TU Darmstadt, Darmstadt, Deutschland**

Tätig im Labor von Prof. Dr. Beatrix Süß

Titel der Dissertation: Kontrolle des prä-mRNA Spleißens durch synthetische Riboswitche

Angestrebter Abschluss: Doktor der Naturwissenschaften (Doctor rerum naturalium)

2012 **Forschungsaufenthalt an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Deutschland**

im Labor von Prof. Dr. Günter Mayer

Berufserfahrung

2009 – 2011 **GenXPro, Frankfurt am Main, Deutschland**

Werksstudent (Forschung und Entwicklung)

Mitgliedschaften

Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft e.V. (2010-2012)

International Society on Aptamers (seit 2014)

Darmstadt, den 12.02.2015

Publikationen

- Scheider, J., Afonso-Grunz, F., Hoffmeier, K., Horres, R., **Groher, F.**, Rycak, L., Oehlmann, J., and Winter, P. (2014). **Gene Expression of Chicken Gonads Is Sex- and Side-Specific.** *Sex Dev* 8, 178–191.
- Groher, F.**, and Suess, B. (2014). **Synthetic riboswitches - A tool comes of age.** *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 964–973.
- Gottstein-Schmidtke, S.R., Duchardt-Ferner, E., **Groher, F.**, Weigand, J.E., Gottstein, D., Suess, B., and Wöhnert, J. (2014). **Building a stable RNA U-turn with a protonated cytidine.** *Rna* 20, 1163–1172.
- Weigand, J.E., Gottstein-Schmidtke, S.R., Demolli, S., **Groher, F.**, Duchardt-Ferner, E., Wöhnert, J., and Suess, B. (2014). **Sequence elements distal to the ligand binding pocket modulate the efficiency of a synthetic riboswitch.** *ChemBioChem* 15, 1627–1637.
- Kahl, G. (2015). *The Dictionary of Genomics, Transcriptomics and Proteomics* (Wiley-Blackwell).
- Berens, C., **Groher, F.**, and Suess, B. (2015). **RNA aptamers as genetic control devices.** *J. Biotechnol.* 10 (2) pp. 246-257
- Özçoban, C., Halbritter, T., Steinwand, S., Herzig, L.-M., Kohl-Landgraf, J., Askari, N., **Groher, F.**, Fürtig, B., Schwalbe, H., Suess, B., et al. **Water-Soluble Py-BIPS Spiropyrans as Photoswitches for Biological Applications.** *Org. Lett.* 17 (2015) 1517–1520. doi:10.1021/acs.orglett.5b00397.
- Groher, F.** and Suess, B. (2015). **Aptamer controlled intron retention.** *In Vorbereitung.*

Besuchte Veranstaltungen und Seminare

- Internationales Symposium der GBM-Studiengruppe Molekulare Lebenswissenschaften (2011), Frankfurt am Main, Deutschland (Teilnahme)
- Kick-off-Meeting des SFB902 (2011), Königstein, Deutschland (Vortrag)
- EFB “Applied Synthetic Biology in Europe” (2012), Barcelona, Spanien (Posterpräsentation)
- 25ter RNA-Club (2012), Frankfurt am Main, Deutschland (Moderation)
- Winterschule des SFB902 in Obergurgl (2013), Obergurgl, Österreich (Vortrag)
- Aptamers 2014 (2014), Oxford, UK (Posterpräsentation)
30. Rabensteiner Kolleg (2014), Pottenstein, Deutschland (Vortrag)
- Internationales Symposium der GBM-Studiengruppe RNA-Biochemie 2014, Schwerpunkt RNA-Modifikationen (2014), Bonn, Deutschland (Posterpräsentation)
- ERASynBio Networking Workshop 2014 (2014), Brüssel, Belgien (Teilnahme)

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 13.02.2015

.....

(Florian Groher)